



IPW

PTO/SB/21 (04-07)

Approved for use through 09/30/2007. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

TRANSMITTAL FORM

(to be used for all correspondence after initial filing)

Total Number of Pages in This Submission

Application Number	10/714,449 – Conf. #9366
Filing Date	November 17, 2003
First Named Inventor	Laguens
Art Unit	1633
Examiner Name	S. Kaushal
Attorney Docket Number	42597-193226

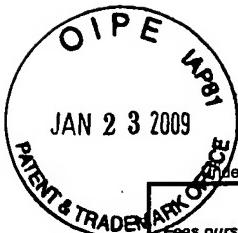
ENCLOSURES (Check all that apply)

<input checked="" type="checkbox"/> Fee Transmittal Form <input type="checkbox"/> Fee Attached <input checked="" type="checkbox"/> Communication <input type="checkbox"/> After Final <input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s) <input type="checkbox"/> Extension of Time - 2 month <input type="checkbox"/> Express Abandonment Request <input type="checkbox"/> 1.132 Declaration (w/Curriculum Vitae 43 pp.) – Appendix B <input type="checkbox"/> Issue/Publication Fee Transmittal <input type="checkbox"/> IDS w/PTO Form SB08 and 4 references <input type="checkbox"/> Reply to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53	<input type="checkbox"/> Drawing(s) <input type="checkbox"/> Licensing-related Papers <input type="checkbox"/> Petition <input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application <input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation <input type="checkbox"/> Change of Correspondence Address <input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer <input type="checkbox"/> Request for Refund <input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) <input type="checkbox"/> Landscape Table on CD	<input type="checkbox"/> After Allowance Communication to TC <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences <input type="checkbox"/> Appeal Communication to TC (Appeal Notice, Brief, Reply Brief) <input type="checkbox"/> Proprietary Information <input type="checkbox"/> Status Letter <input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below): Argentinean Priority Document P01-01-02313
<input type="checkbox"/> Remarks		

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT

Firm Name	VENABLE LLP		
Signature			
Printed name	Nancy J. Axelrod, Ph.D.		
Date	January 23, 2009	Reg. No.	44,014

937227



JAN 23 2009

PTO/SB/17 (10-07)
Approved for use through 06/30/2010. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no person are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Effective on 12/08/2004. Fees pursuant to the Consolidated Appropriations Act, 2005 (H.R. 4818). FEE TRANSMITTAL For FY 2008		Complete if Known	
		Application Number	10/714,449-Conf. #9366
		Filing Date	November 17, 2003
		First Named Inventor	Laguens
		Examiner Name	S. Kaushal
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27		Art Unit	1633
TOTAL AMOUNT OF PAYMENT (\$ 0.00)		Attorney Docket No. 42597-193226	

METHOD OF PAYMENT (check all that apply)					
<input type="checkbox"/> Check <input type="checkbox"/> Credit Card <input type="checkbox"/> Money Order <input type="checkbox"/> None <input type="checkbox"/> Other (please identify): _____					
<input checked="" type="checkbox"/> Deposit Account		Deposit Account Number:	22-0261	Deposit Account Name:	Venable LLP
For the above-identified deposit account, the Director is hereby authorized to: (check all that apply)					
<input checked="" type="checkbox"/> Charge fee(s) indicated below			<input type="checkbox"/> Charge fee(s) indicated below, except for the filing fee		
<input checked="" type="checkbox"/> Charge any additional fee(s) or underpayments of fee(s) under 37 CFR 1.16 and 1.17			<input checked="" type="checkbox"/> Credit any overpayments		

FEE CALCULATION							
1. BASIC FILING, SEARCH, AND EXAMINATION FEES							
<u>Application Type</u>	<u>FILING FEES</u>		<u>SEARCH FEES</u>		<u>EXAMINATION FEES</u>		
	<u>Fee (\$)</u>	<u>Small Entity Fee (\$)</u>	<u>Fee (\$)</u>	<u>Small Entity Fee (\$)</u>	<u>Fee (\$)</u>	<u>Small Entity Fee (\$)</u>	<u>Fees Paid (\$)</u>
Utility	310	155	510	255	210	105	_____
Design	210	105	100	50	130	65	_____
Plant	210	105	310	155	160	80	_____
Reissue	310	155	510	255	620	310	_____
Provisional	210	105	0	0	0	0	_____
2. EXCESS CLAIM FEES							
<u>Fee Description</u> Each claim over 20 (including Reissues) _____ Each independent claim over 3 (including Reissues) _____ Multiple dependent claims _____							
<u>Total Claims</u>	<u>Extra Claims</u>	<u>Fee (\$)</u>	<u>Fee Paid (\$)</u>	<u>Multiple Dependent Claims</u>			
- = _____	x _____	= _____		<u>Fee (\$)</u>	<u>Fee Paid (\$)</u>		
HP = highest number of total claims paid for, if greater than 20.							
<u>Indep. Claims</u>	<u>Extra Claims</u>	<u>Fee (\$)</u>	<u>Fee Paid (\$)</u>				
- = _____	x _____	= _____					
HP = highest number of independent claims paid for, if greater than 3.							
3. APPLICATION SIZE FEE							
If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper (excluding electronically filed sequence or computer listings under 37 CFR 1.52(e)), the application size fee due is \$260 (\$130 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).							
<u>Total Sheets</u>	<u>Extra Sheets</u>	<u>Number of each additional 50 or fraction thereof</u>	<u>Fee (\$)</u>	<u>Fee Paid (\$)</u>			
- 100 = _____	/50 = _____	(round up to a whole number) x _____ = _____					
4. OTHER FEE(S)							
Other (e.g., late filing surcharge): _____							

SUBMITTED BY					
Signature	<i>Nancy Axelrod</i>		Registration No. (Attorney/Agent)	44,014	Telephone (202) 344-4000
Name (Print/Type)	Nancy J. Axelrod, Ph.D.		Date	January 23, 2009	

975238



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:

Laguens *et al.*

Art Unit: 1633

Application No: 10/714,449

Examiner: S. Kaushal

Confirmation No: 9366

Filed: November 17, 2003

Atty. Docket No: 42597-193226

For: METHOD TO INDUCE NEOVASCULAR
FORMATION AND TISSUE
REGENERATION

Customer No:

26694

PATENT TRADEMARK OFFICE

COMMUNICATION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Madame:

In response to a telephone call from the Examiner in the above-referenced application, we have enclosed a certified copy of the Argentinean priority document in the application: P01-01-02313 ARGENTINA, filed May 15, 2001.

We previously filed, on December 24, 2008, a certified English translation of this document.

The Commissioner is hereby authorized to charge any fees association with this response or credit any overpayment to Deposit Account No. 22-0261, citing Docket No. 42597-193226.

Respectfully submitted,

Dated: January 23, 2009

By Nancy Axelrod
Nancy J. Axelrod, Ph.D.
Registration No.: 44,014
VENABLE LLP
P.O. Box 34385
Washington, DC 20043-9998
(202) 344-4000
(202) 344-8300 (Fax)
Attorney/Agent For Applicant

1010368



REPÚBLICA ARGENTINA
PODER EJECUTIVO NACIONAL
MINISTERIO de ECONOMÍA y PRODUCCIÓN
SECRETARÍA de INDUSTRIA, COMERCIO y de la PEQUEÑA y MEDIANA EMPRESA
INSTITUTO NACIONAL de la PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO DE
DEPÓSITO

COPIA OFICIAL CONVENIO DE PARIS - LISBOA 1958 -

ACTA N° P 2001 0102313

LA ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES, CERTIFICA QUE CON FECHA 15 DE MAYO DE 2001 SE PRESENTÓ A NOMBRE DE BIO SIDUS S.A. 50.00 % FUNDACION UNIVERSITARIA DR. RENE G. FAVALORO 50.00 %; CON DOMICILIO LEGAL EN ALSINA 971 PISO 1 OF.10, CAPITAL, REPUBLICA ARGENTINA (AR).

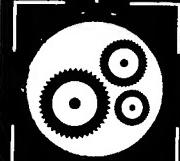
UNA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION RELATIVA A: METODO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION NEOVASCULAR Y REGENERACION TISULAR

LA DESCRIPCION Y DIBUJOS ADJUNTOS SON COPIA FIEL DE LA DOCUMENTACION DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

SE CERTIFICA QUE LO ANEXADO A CONTINUACION EN 43 FOJAS ES COPIA FIEL DE LOS DOCUMENTOS DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES DE LA REPUBLICA ARGENTINA DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PRECEDENTEMENTE IDENTIFICADA.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, A LOS 9 DÍAS DEL MES DE ENERO DE 2009.

DR. EDUARDO ARIAS
COMISARIO
ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES



Patentes de Invención
Modelos de Utilidad



Marcas



Modelos y Diseños
Industriales



Transferencia de
Tecnología



Información
Tecnológica



INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
ARGENTINA



Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

Método para Inducir la Proliferación Neovascular y
Regeneración Tisular

Solicitada por

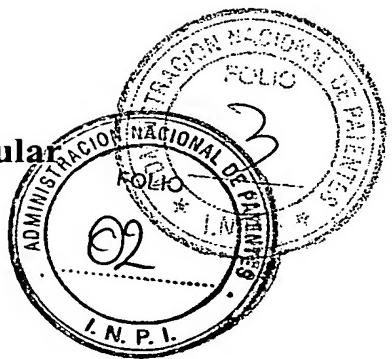
**Bio Sidus S.A. y
Fundación Universitaria Dr. René G. Favaloro**

Por el plazo de 20 años



Buenos Aires - Argentina

Método para Inducir la Proliferación Neovascular y Regeneración Tisular



5

Descripción Técnica de la Invención

Método para inducir la proliferación neovascular y regeneración tisular mediante el uso del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). En 10 particular, un método para la inducción localizada de la proliferación neovascular y regeneración tisular *in vivo* en mamíferos mediante el uso del VEGF.

Campo Técnico de la Invención

La presente invención se refiere a un método para estimular la 15 revascularización y regeneración tisular.

Estado de la Técnica

La cardiopatía isquémica es la principal causa de morbi-mortalidad. El impacto epidemiológico y económico social de la enfermedad coronaria es notable. 20 En el año 1990 esta patología causó alrededor de 6,3 millones de muertes en todo el mundo. Ver Murray, *et al.*, *Lancet*, 349:269-276 (1997). Los países subdesarrollados se ven particularmente afectados por esta patología, mostrando un exceso relativo del 70% con respecto a los países desarrollados. Ver Reddy, *et al.*, *Circulation*, 97:596-601 (1998). En la Argentina, es la primera causa de mortalidad con una incidencia 25 aproximada de 30%, que tiende a mantenerse estable desde 1980. En el grupo etario mayor de 65 años esta tasa llega casi al 40%. Ver Programa de Nacional de Estadísticas de Salud, Serie 5, Núm. 38 (1994).

A pesar de los avances recientes en la prevención y tratamiento de la cardiopatía isquémica, existen muchos pacientes que continúan sintomáticos y que no 30 pueden beneficiarse con la terapéutica convencional. La administración de factores de crecimiento que promueven la neoformación vascular, como los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y el VEGF, aparece como una alternativa nueva y

FOLIO
4
03
I.N.P.I.

promatoria para estos pacientes. Esta modalidad de tratamiento se denomina angiogénesis terapéutica. Ver Henry, *B. M. J.*, 318:1536-1539 (1999).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una proteína producida por células del músculo esquelético, músculo liso, células del cuerpo lúteo, 5 células tumorales, fibroblastos y miocitos cardíacos. El VEGF, a diferencia de otros factores de crecimiento, es secretado por la célula que lo produce. Ver Thomas, *J. Biol. Chem.*, 271:603-606 (1996); Leung, *et al.*, *Science*, 246:1306-1309 (1989). En tejidos no malignos, el gen de VEGF humano se expresa en cuatro isoformas secundarias al *splicing* alternativo post-transcripcional, produciendo proteínas con 10 diferente cantidad de aminoácidos. Al presente, se conocen proteínas VEGF de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos, con un peso molecular que varía de 34 a 46 kD. Ver Tischer, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954 (1991); Ferrara, *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218 (1991).

Los receptores específicos para VEGF son VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 15 (KDR/flk-1) y VEGFR-3 (flt-4). Ver De Vries, *et al.*, *Science*, 254:989-991 (1992); Terman, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187:1579-1586 (1992); Gallant, *et al.*, *Genomics*, 13:475-478 (1992). Debido a la localización de estos receptores, aparentemente predominante en células endoteliales, el VEGF ha sido descrito como específicamente selectivo para estas células. Se ha planteado la inactividad del VEGF 20 sobre células no endoteliales. Ver Jakeman, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 89:244-253 (1992); Ferrara, *et al.*, *Endocr. Rev.*, 18:4-25 (1997); Thomas, *et al.*, *supra* (1996).

La administración de VEGF con fines terapéuticos representa un desafío importante. El VEGF puede ser administrado como proteína recombinante (terapia proteica) o transfiriendo genes que lo codifican (terapia génica). Ver Safi, *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29:2311-2325 (1997); Simons, *et al.*, *Circulation*, 102:E73-E86 (2000).

La terapia proteica presenta desventajas relevantes. La vida media ultracorta de la proteína condiciona la terapia al uso de dosis altas o repetidas para conseguir el efecto terapéutico. Ver Simons, *et al.*, *supra* (2000); Takeshita, *et al.*, *Circulation* 30 90:II228-234 (1994). Se ha comprobado que la administración endovenosa de altas dosis de VEGF proteico produce hipotensión refractaria grave. Ver Henry, *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31:65A (1998); Horowitz, *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 17:2793-2800 (1997); Lopez, *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 273:H1317-1323 (1997). Para evitar los problemas relacionados con la terapia proteica, se ha descrito el uso de

terapia génica con ADN genómico codificante para VEGF. Ver Mack, *et al.*, *J Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 115:168-177 (1998); Tio, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10:2953-2960 (1999).

La terapia génica puede compararse con un sistema de liberación prolongada de componentes activos. El gen que codifica para el agente inductor de interés es transportado hacia el interior de la célula en vehículos llamados vectores (plásmidos, virus, liposomas). La maquinaria celular especializada en la síntesis de proteínas es la encargada de la producción y liberación sostenida y localizada del producto final. Ver Crystal, *Science*, 270:404-410 (1995). Además, es importante aclarar que el producto es sintetizado por un periodo de tiempo finito, de aproximadamente dos semanas. Según estudios experimentales, la expresión sostenida durante este tiempo limitado es necesaria y suficiente para desencadenar el proceso angiogénico. Basándose en estas ventajas, varios grupos han estudiado los efectos terapéuticos de la terapia génica con factores angiogénicos en modelos de isquemia central y periférica obteniendo resultados positivos. Ver Magovern, *Ann. Thorac. Surg.*, 62:425-434 (1996); Mack, *et al.*, *supra* (1998); Tio, *et al.*, *supra* (1999); Walder, *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 27:91-98 (1996); Takeshita, *et al.*, *Lab. Invest.*, 75:487-501 (1996); Mack, *et al.*, *Gen. Vasc. Surg.*, 27:699-709 (1998); Tsurumi, *et al.*, *Circulation*, 94:3281-3290 (1996). La terapia génica ha demostrado conseguir el efecto deseado sin los inconvenientes relacionados con la terapia proteica. La terapia génica adenoviral posee un alto riesgo de reacción inflamatoria o inmune sistémica, mucho mayor en dosis repetidas. Esto representa una limitación importante para este tipo de terapia. Ver Gilgenkrantz, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 6:1265-1274 (1995); Dewey, *et al.*, *Nat. Med.*, 5:1256-1263 (1999); Werston, *et al.*, *J. Virol.*, 72:9491-9502 (1998); Hollon, *Nat. Med.*, 6:6 (2000), Chang, *et al.*, *Nat. Med.*, 5:1143-1149 (1999); Byrnes, *et al.*, *J. Nerosci.*, 16:3045-3055 (1996). Según datos disponibles actualmente, la terapia génica plasmídica no posee estos inconvenientes, siendo más segura y permitiendo administraciones múltiples. Ver Simons, *et al.*, *supra* (2000).

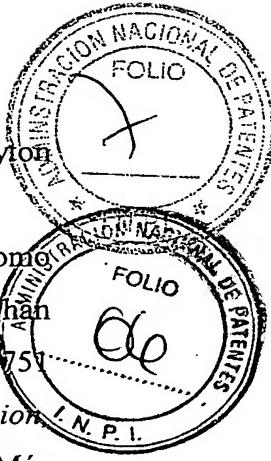
La administración sistémica de VEGF se ha asociado con el riesgo potencial de inducir angiogénesis no deseada en tejidos periféricos. Ver Folkman, *Nat. Med.*, 1:27-31 (1995); Liotta, *et al.*, *Cell*, 64:327-336 (1991); Lazarous, *et al.*, *Circulation*, 94:1074-1082 (1996); Ferrara, *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137 (1995); Ferrara, *Lab. Invest.*, 72:615-618 (1995); Aiello, *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 331:1480-1485 (1994); Adams, *et al.*, *Am. J. Ophthalmol.*, 118:445-450 (1994); Inoue, *et al.*,

Circulation, 98:2108-2116 (1998); Simons, *et al.*, *supra* (2000). Con respecto a la especificidad de sitio y al menor riesgo de exposición sistémica, se discute cuál tipo de terapia es más eficaz. Estos efectos probablemente dependan más de la vía de administración que de la naturaleza del tratamiento. Se ha sugerido que la administración local disminuye el riesgo de angiogénesis periférica no deseada. Ver Simons, *et al.*, *supra* (2000).

Al presente, sólo se ha demostrado que el VEGF induce la angiogénesis de vasos sin capa muscular lisa *in vivo*. Ver Mack, *et al.*, *supra* (1998); Tio, *et al.*, *supra* (1999). Es más, se ha postulado que el VEGF inhibe la neoformación de músculo liso vascular. Ver Asahara, *et al.*, *Circulation* 91:2793-2801 (1995). El músculo liso cumple un rol muy importante en la regulación de la función vascular. Su presencia en la túnica media de los vasos representa una ventaja adaptativa, ya que participa en la regulación del tono vasomotor. El músculo liso vascular mantiene un tono vascular basal y permite la autorregulación del mismo frente a variaciones de flujo y presión. Se ha postulado que la ausencia de capa muscular lisa está relacionada con el colapso de los vasos. Ver "Angiogenesis and Cardiovascular Disease", Ware, Ed., (Oxford University Press Inc., New York, EE.UU., 1999), pp. 258-261.

El infarto agudo de miocardio es la consecuencia de la enfermedad coronaria con peor pronóstico a corto y largo plazo. Ver Bolognese, *et al.*, *Am. Heart J.*, 138:S79-83 (1999); Mehta, *et al.*, *Herz*, 25:47-60 (2000); Hessen, *et al.*, *Cardiovasc. Clin.*, 20:283-318 (1989); Jacoby, *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 20:736-744 (1992); Rosenthal, *et al.*, *Am. Heart J.*, 109:865-876 (1985). Es frecuente que genere una pérdida significativa de células miocárdicas. Esto causa una reducción importante de la masa miocitaria. Es conocido que los miocardiocitos del ser humano, y de otras especies filogenéticamente cercanas como los cerdos, preservan la capacidad de replicar su ADN, sin embargo muy raramente se multiplican generando células hijas. En la gran mayoría de los casos, estas células no son capaces de progresar en el ciclo celular y entrar en fase M (mitótica). Ver Kajstrua, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8801-8805 (1998); Pfizer, *et al.*, *Curr. Top. Pathol.*, 54:125-168 (1971).

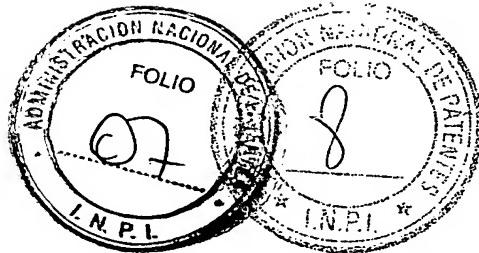
La incapacidad de los miocardiocitos para replicarse adecuadamente impide la restitución necesaria del tejido miocárdico en las especies animales superiores. Consecuentemente, la capacidad funcional miocárdica disminuye, ya que el área infartada es reemplazada por tejido fibrótico, sin capacidad contráctil. Además, los miocardiocitos se hipertrófian y desarrollan núcleos poliploides. Ver Herget, *et al.*,



Cardiovasc. Res. 36:45-51 (1997); "Tratado de Fisiología Médica", 9na. Ed., Guyton et al., Eds., (Mc Graw-Hill Interamericana, México, 1997), pp. 276-279, 280-284.

Se ha intentado restituir la pérdida de miocardiocitos con otras células, como células satélites autólogas y mioblastos alogénicos. Al presente, estos intentos han tenido poco éxito. Ver Dorfman, et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 116:744-751 (1998); Murry, et al., *J. Clin. Invest.*, 98: 2512-2523 (1996); Leor, et al., *Circulation*, 94 Suppl. II: II-332-II-336 (1996); Ren-Ke, et al., *Circ. Res.*, 78:283-288 (1996). Más recientemente, se ha sugerido que células madres pluripotentes y angioblastos derivados de la médula ósea podrían restituir el tejido miocárdico infartado e inclusive inducir proliferación vascular. Sin embargo, no se ha demostrado todavía la efectividad de estos métodos en mamíferos superiores. Ver Orlic, et al., *Nature*, 410:701-705 (2001); Kocher, et al., *Nat. Med.*, 7:430-436 (2001). Un método ideal induciría la multiplicación de los miocardiocitos originando células hijas y la proliferación vascular en el tejido miocárdico. Este procedimiento restituiría la pérdida tisular con tejido miocárdico autólogo y aumentaría simultáneamente la perfusión miocárdica, disminuyendo la morbi-mortalidad asociada con el remodelamiento ventricular izquierdo y la cardiopatía isquémica. Ver Bolognese, et al., *supra* (1999).

La falta de capacidad mitótica impide el aumento del número de células (hiperplasia) frente a otras noxas. En estos casos, la respuesta adaptativa de los miocardiocitos humanos y porcinos es el aumento del volumen celular. Por lo tanto, en ciertas patologías (por ejemplo hipertrofia hipertensiva, miocardiopatía dilatada, etc.), los miocardiocitos también se encuentran marcadamente hipertróficos y poliploides. Ver Pfizer, *Curr. Top. Pathol.*, 54:125-168 (1971); Adler, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18:39-53 (1986). En la gran mayoría de los casos, esta adaptación celular es insuficiente. Por otra parte, la hipertrofia miocárdica progresiva aumenta la demanda celular de oxígeno y nutrientes reduciendo consecuentemente la perfusión subendocárdica, aun en ausencia de obstrucciones coronarias. Finalmente, la combinación de estos factores conlleva al deterioro de la función miocárdica. Ver "Tratado de Fisiología Médica", 9na. Ed, *supra*, pp. 276-279, 307-308. Un método ideal, induciría la mitosis completa de estas células hipertróficas poliploides en células hijas más pequeñas y mejor perfundidas, reduciendo la progresión de la miocardiopatía hacia la insuficiencia cardíaca.



Diagramas

La Fig. 1 ilustra el índice de esfuerzo. Se comparan los valores promedios pre y post-tratamiento para el Grupo I-T (VEGF) y el Grupo I-P (placebo). Se observa que el valor post-tratamiento del Grupo I-T es mayor al valor pre-tratamiento del mismo grupo y a los valores pre y post-tratamiento del Grupo I-P. Las comparaciones apareadas demuestran: 1) ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices pre y post-tratamiento del Grupo I-P, 2) presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices pre y post-tratamiento del Grupo I-T.
Las comparaciones no apareadas demuestran: 1) ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices pre-tratamiento del Grupo I-T y el Grupo I-P, 2) presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices post-tratamiento del Grupo I-T y el Grupo I-P.

La Fig. 2 ilustra el índice mejoría de perfusión. Se comparan los valores promedio para el Grupo I-T (VEGF) y el Grupo I-P (placebo). Se observa que el valor del Grupo I-T es significativamente mayor al valor del Grupo I-P.

La Fig. 3 muestra la densidad de longitud para el área de riesgo. Se ilustran los valores promedio para vasos de 8 a 50 μm con capa muscular lisa. Se observa que el valor del Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor al valor del Grupo I-P (placebo).

La Fig. 4 muestra la densidad de longitud para el área de riesgo. Se ilustran los valores promedio para vasos de 8 a 30 μm con capa muscular lisa. Se observa que el valor del Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor al valor del Grupo I-P (placebo).

La Fig. 5 ilustra el promedio de la densidad de mitosis para el área de riesgo. Se observa que el valor del Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor al valor del Grupo I-P (placebo).

La Fig. 6 representa la curva de transcripción de ADN genómico (ARN mensajero) mediante RT-PCR en el Grupo I-T.

La Fig. 7 ilustra la metafase de un miocardiocito de un individuo del Grupo I-T. La flecha muestra la placa ecuatorial y las fibras del huso.

La Fig. 8 ilustra la telofase de un miocardiocito de un individuo del Grupo I-T. La flecha señala las estriaciones sarcoméricas.

La Fig. 9 ilustra el proceso mitótico de dos miocardiocitos adyacentes. La flecha señala el límite entre ellas. Se observa la integridad de ambos miocardiocitos.

Las Figs. 10 y 11 ilustran la neoproliferación de vasos con capa muscular lisa (angiogénesis) en tejido miocárdico. El músculo liso vascular fue identificado con tinción diferencial para alfa-actina (inmunohistoquímica).

Depósito

El plásmido pUVEK15 fue depositado el 13 de noviembre de 2000, bajo el número de acceso DSM 13833 en DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, República Federal Alemana.

Descripción de la Invención

Una de las ventajas de la presente invención es que induce de manera efectiva y segura la proliferación vascular en tejidos hipoperfundidos y normoperfundidos. Mediante el uso del método reivindicado es posible estimular la neoformación y crecimiento de vasos y células musculares, tanto lisas como estriadas. El método es especialmente útil para inducir la revascularización en pacientes que padecen cardiopatía isquémica. Mediante el método reivindicado se evitan los efectos adversos relacionados con la exposición sistémica a altas dosis de factores angiogénicos.

Otra de las ventajas de la presente invención es que regenera el tejido miocárdico (miocardiogénesis). Según el método reivindicado se estimula la mitosis de miocardiocitos favoreciendo la reposición del tejido infartado. El método reivindicado revierte el curso natural de miocardiopatías hipertróficas y dilatadas de cualquier etiología, estimulando la mitosis de miocardiocitos hipertróficos poliploides y la proliferación vascular. Esto redunda en mayor cantidad de células hijas normales y mejor perfundidas, mejorando el pronóstico y la evolución de esas cardiopatías.

Otra ventaja de la presente invención es su posible uso para revascularizar efectiva y eficientemente el miocardio de pacientes transplantados con rechazo crónico del injerto y enfermedad coronaria difusa. El presente método restauraría la perfusión deteriorada en estos pacientes intratables por métodos convencionales de revascularización.

FOLIO 09
I.N.P.I.

Una ventaja adicional de la presente invención es su posible uso para aumentar la perfusión en tejidos hipoperfundidos de pacientes con micro y macroangiopatía diabética. El método reivindicado puede mejorar las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes tales como neuropatía diabética, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica y enfermedades isquémicas de los miembros, entre otras. Ker Schatzberger, et al., *J. Clin. Invest.*, 107:1083-1092 (2001); Rivard, et al., *Circulation* 96 Suppl I: 175. (1997); Rivard, et al., *Am. J. Pathol.*, 154: 355-363 (1999).

Una de las ventajas del método reivindicado es su mayor seguridad cuando se utiliza en conjunción con procedimientos poco invasivos para la administración intramiocárdica transendocárdica de medicamentos mediante catéteres. El acceso a la cámara ventricular izquierda en estos casos es por vía endovascular. Este tipo de administración se facilitaría, además, mediante el mapeo electromecánico del ventrículo izquierdo. De esta manera se evita el acceso quirúrgico y la morbi-mortalidad asociada a cirugías torácicas a cielo abierto.

La presente invención se refiere a un método para inducir la proliferación neovascular y regeneración tisular que se caracteriza por administrar a un tejido una secuencia de nucleótidos codificante para el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1. En una versión de la presente invención, se administra una secuencia de nucleótidos codificante para un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO. 1. En otra versión de la presente invención, se administra el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1. En otra forma de llevar a cabo el presente método, se administra un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1. La secuencia de nucleótidos puede ser ADN genómico, ADN copia y ARN mensajero. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos es ADN genómico.

Según la presente invención, se administra el agente inductor a un tejido compuesto por células eucariotas, como las de mamífero. Preferentemente, las células de mamífero son de origen porcino y humano. Más preferentemente, las células son de origen humano.

Según el método reivindicado, las células eucariotas son células musculares. Preferentemente, las células musculares utilizadas son miocardiocitos, células musculares estriadas esqueléticas tipo I y tipo II, células musculares lisas vasculares y



no vasculares, y células mioepiteliales. Más preferentemente, las células musculares utilizadas son miocardiocitos.

El método reivindicado se caracteriza por inducir la proliferación vascular. Preferentemente, la proliferación vascular inducida es localizada en la zona de administración del agente inductor. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio.

El método reivindicado se caracteriza por inducir angiogénesis localizada, *in vivo* y *ex vivo*. Preferentemente, la angiogénesis es localizada en la zona de administración del agente inductor. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio. En una versión de la presente invención, se induce angiogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra versión de la presente invención se induce angiogénesis en tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, el método reivindicado induce angiogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, atontado, precondicionado, lesionado, con injuria, infartado, no-viable, fibrosado y necrosado. Más preferentemente, el método reivindicado induce angiogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por inducir arteriogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, la arteriogénesis es localizada en la zona de administración. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio. En una versión de la presente invención, se induce arteriogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra versión de la presente invención, se induce arteriogénesis en tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, el método reivindicado induce arteriogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, atontado, precondicionado, lesionado, con injuria, infartado, no-viable, fibrosado y necrosado. Más preferentemente, el método reivindicado induce arteriogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por inducir vasculogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, la vasculogénesis es localizada en la zona de administración. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio. En una versión de la presente invención, se induce vasculogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra versión de la presente invención, se induce vasculogénesis en tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.

Preferentemente, el método reivindicado induce vasculogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico; viable, hibernado, atontado, precondicionado, lesionado, con injuria, no-viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferentemente, el método reivindicado induce vasculogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por inducir linfangiogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, la linfangiogénesis es localizada en la zona de administración. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio. En una versión de la presente invención, se induce linfangiogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra versión de la presente invención, se induce linfangiogénesis en tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, el método reivindicado induce linfangiogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, atontado, precondicionado, lesionado, con injuria, no-viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferentemente, el método reivindicado induce linfangiogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por inducir mitosis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, se induce mitosis de manera localizada en la zona de administración. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio. En una versión de la presente invención, se induce mitosis en tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra versión de la presente invención, se induce mitosis en tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, el método reivindicado induce mitosis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, atontado, precondicionado, lesionado, con injuria, no-viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferentemente, el método reivindicado induce mitosis en tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

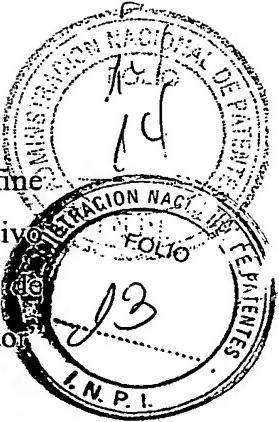
El método reivindicado también se caracteriza por inducir la regeneración tisular *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, se induce la regeneración tisular de manera localizada en la zona de administración. Más preferentemente, la zona de administración es el miocardio. En una versión de la presente invención, se induce la regeneración tisular en territorios normoperfundidos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra versión de la presente invención, se induce la regeneración tisular en territorios isquémicos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferentemente, el método reivindicado induce

la regeneración tisular en territorios miocárdicos hipoperfundidos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El territorio miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, atontado, precondicionado, lesionado, con injuria, no-viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferentemente, el método reivindicado induce la regeneración tisular en territorios miocárdicos hipoperfundido *in vivo*.

En una versión de la presente invención la secuencia de nucleótidos codificante está operativamente conectada a un vector. En una versión del método reivindicado el vector es un vector viral como adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y lentivirus. En otra versión del presente método, el vector es un vector plasmídico. Más preferentemente, el vector plasmídico es pUVEK15. En otra versión de la presente invención, la secuencia de nucleótidos se vehiculiza mediante el uso de un liposoma. En una versión de la presente invención, el agente inductor está contenido en una composición farmacéutica adecuada. La composición farmacéutica conteniendo el agente inductor se administra al receptor en dosis suficientes.

La composición farmacéutica utilizada según la presente invención puede administrarse por vía endovenosa, intracoronaria, intraórtica, intrafemoral, intrapoplítea, intrapedia, intratibial posterior, intracarotídea e intrarradial. También puede administrarse por vía intrapericárdica, intraperitoneal, intraamniótica, intrapleural, intramiocárdica transepícardica, intramiocárdica transendocárdica e intramuscular periférica, subcutánea, intrarraquídea, intracardíaca intraatrial e intracardíaca intraventricular. Otra forma de administrar el agente inductor es por vía sublingual, inhalatoria, oral, rectal, periadventicial, perivasculares, tópica epicárdica, epidérmica, transdérmica, oftálmica, a través de las mucosas conjuntival, nasofaríngea, bucofaríngea, laringofaríngea, vaginal, colónica, uretral y vesical. Preferentemente, el agente inductor se administra por inyección intramiocárdica transepícardica y transendocárdica. Más preferentemente, el agente inductor se administra por inyección intramiocárdica transepícardica.

En una versión de la presente invención, el agente inductor se inyecta preferentemente de manera perpendicular al plano del área de inyección. En otra versión de la presente invención, el agente inductor se inyecta de manera oblicua al plano del área de inyección. En otra versión de la presente invención, el agente inductor se inyecta de manera paralela al plano del área de inyección. Preferentemente, las inyecciones se distribuyen homogéneamente en el área de inyección.



Tal como se utiliza en la presente descripción, "agente inductor" se define como el ADN genómico, ADN copia, ARN mensajero codificante para el sitio activo del VEGF. "Agente inductor" también incluye cualquier vector cuya secuencia de nucleótidos codifique para VEGF. Se entiende también como "agente inductor" cualquier polipéptido que incluya al sitio activo del VEGF.

Tal como se utiliza en la presente descripción, "área de inyección" se define como el área integrada por la zona hipoperfundida, la zona de transición y el tejido normoperfundido inmediatamente circundante a la zona de transición.

Tal como se utiliza en la presente descripción, "área de riesgo" significa el área miocárdica irrigada principalmente por la arteria coronaria circunfleja.

Tal como se utiliza en la presente descripción, "arteriogénesis" se define como el desarrollo de vasos cuya túnica media está compuesta por células musculares lisas.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "células indiferenciadas" se define como toda célula pluripotente que puede dar origen a células de diferente estirpe o linaje celular y a la misma vez dar origen a otra célula pluripotente. Estas células presentan características diferentes a todas las estirpes y linajes celulares conocidos que constituyen los tejidos adultos. Las "células indiferenciadas" incluyen, pero no están limitadas a, células madres (*stem cells*), células mesenquimáticas, hemangioblastos, angioblastos y células precursoras hematopoyéticas.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "células poco diferenciadas" se define como toda célula que posee características propias de un linaje o estirpe celular pero que puede dar origen a otras células de diferente linaje o estirpe. Las "células poco diferenciadas" incluyen, pero no están limitadas a, los fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, células precursoras endoteliales, células satélites del músculo esquelético y células gliales del tejido nervioso.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "comparación apareada" se refiere a la comparación estadística de tiempos evolutivos diferentes de un mismo grupo de individuos.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "comparación no apareada" se refiere a la comparación estadística de dos grupos de individuos en un mismo tiempo evolutivo.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "composición farmacéutica" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se

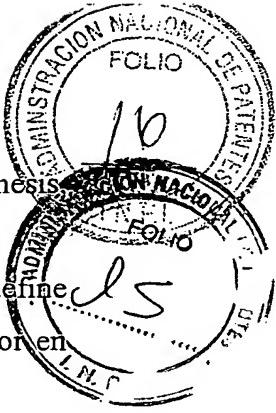
administra un agente inductor. Incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, soluciones acuosas, gaseosas, recubrimientos, agentes antibacterianos antifúngicos, agentes isotónicos, retardadores o aceleradores de la absorción, sustancias similares. El uso de dichos medios y agentes en la administración de sustancias activas farmacéuticas es conocido en el arte. Salvo en la medida en que algún medio o agente convencional sea incompatible con el agente inductor, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas. Los principios activos suplementarios también pueden ser incorporados a los compuestos de la invención. Las "composiciones farmacéuticas" incluyen, pero no están limitadas a, diluyentes o rellenos sólidos inertes, soluciones acuosas estériles y varios solventes orgánicos no tóxicos. La "composición farmacéutica" no deberá reaccionar con, ni de ninguna otra forma reducir la eficacia o estabilidad, del agente inductor. Los transportes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, agua, etanol, polietilenglicol, aceite mineral, petrolatum, propilenglicol, lanolina y agentes similares.

Las "composiciones farmacéuticas" para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la formulación deberá ser estéril y deberá ser fluida en la medida en que posibilite una forma fácil de dispensar en jeringa. También debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y deberá estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias, virus y hongos.

Tal como se utiliza en la presente descripción, "densidad de longitud" se refiere a un parámetro de vascularización de un tejido estudiado histopatológicamente de acuerdo a metodología ya descrita. Este parámetro permite analizar vasos dispuestos en cualquier orientación. *Ver Anversa et al., Am. J. Phisiol., 267: H1062-1073 (1994); Anversa et al., Am. J. Phisiol., 260:H1552-1560 (1991).*

Tal como se utiliza en la presente descripción, "densidad de mitosis" significa el cociente del número de mitosis sobre 10^6 núcleos de miocardiocitos.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "dosis suficiente" significa una cantidad del agente inductor o de la composición farmacéutica que incluye al agente inductor adecuada para llevar a cabo la función especificada. En el contexto de la presente invención "dosis suficiente" se refiere a una cantidad del agente inductor o de la composición farmacéutica que incluye al agente inductor



adecuada para producir uno o más de los siguientes resultados: inducir angiogénesis, arteriogénesis, vasculogénesis, linfangiogénesis o mitosis en células eucariotas.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “índice de esfuerzo” se define como la sustracción aritmética del valor de perfusión en esfuerzo menos el valor en reposo, tanto en condición post-tratamiento como en condición pre-tratamiento.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “índice mejoría de perfusión” se define como la sustracción aritmética entre el índice de esfuerzo post-tratamiento menos el índice de esfuerzo pre-tratamiento.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “índice de esfuerzo post-tratamiento” se define como la sustracción aritmética del valor de perfusión post-tratamiento en esfuerzo menos el valor post-tratamiento en reposo.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “índice de esfuerzo pre-tratamiento” se define como la sustracción aritmética del valor de perfusión pre-tratamiento en esfuerzo menos el valor pre-tratamiento en reposo.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “inducir” con su término relacionado “inducción” se refiere a la acción de generar, promover, regular, facilitar y potenciar un fenómeno biológico. Un ejemplo de inducción es la acción del VEGF como estimulador de la proliferación vascular.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “linfangiogénesis” se define como el desarrollo o proliferación de vasos linfáticos.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “localizado” se define como la limitación de la respuesta a un agente inductor al área de interés.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “mamífero” significa un animal vertebrado de sangre caliente cuya descendencia es alimentada con leche secretada por sus glándulas mamarias. El término “mamífero” incluye, pero no está limitado a, ratas, ratones, conejos, perros, gatos, cabras, ovejas, vacas, ovejas, cerdos, primates y humanos.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “mitosis” se refiere al proceso de división celular.

Tal como se utiliza en la presente descripción, “proliferación neovascular” se define como un aumento de la vascularización de un tejido debido a la expansión del lecho vascular existente o al surgimiento de nuevos lechos vasculares. La proliferación neovascular incluye la angiogénesis, arteriogénesis, vasculogénesis y linfangiogénesis.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "vasculogénesis" define como el desarrollo vascular a partir de células indiferenciadas o poco diferenciadas.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "VEGF" significa cualquier factor de crecimiento del endotelio vascular. "VEGF" incluye, pero no está limitado a, las variantes VEGF A, B, C, D, E y F. Ver Hamawy, *et al.*, *Curr. Opin. Cardiol.*, 14:515-522 (1999); Neufeld, *et al.*, *Prog. Growth Factor Res.*, 5:89-97 (1994); Olofsson, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:2576-2581 (1996); Chilov, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:25176-25183 (1997); Olofsson, *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10:528-535 (1999). La variante VEGF A incluye, pero no está limitada a las isoformas VEGF₁₋₁₂₁, VEGF₁₋₁₄₅, , VEGF₁₋₁₈₉ y VEGF₁₋₂₀₆. La SEQ ID NO. 1 ilustra un ejemplo de la isoforma VEGF₁₋₁₆₅. Ver Tischer, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954 (1991); Poltorak, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:7151-7158 (1997). El término "VEGF" también incluye el factor de permeabilidad vascular o vasculotropina (VPF). Ver Keck, *et al.*, *Science* 246:1309-1312 (1989); Senger, *et al.*, *Science*, 219:983-985 (1983). El VPF se conoce actualmente en la técnica como VEGF A.

La presente invención utiliza un plásmido denominado pUVEK15 de aproximadamente 3068 pares de bases (bp). El plásmido pUVEK15 se caracteriza por incluir un promotor de citomegalovirus (*CMV promoter*), un intrón quimérico, un fragmento de ADN contenido la secuencia codificante del factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF) y una secuencia de ADN de aproximadamente 1290 pb que confiere resistencia a la kanamicina. El plásmido pUVEK15 se encuentra depositado bajo el número de acceso DSM 13833 en DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, República Federal Alemana.

Habiendo descripto en términos generales la invención, la misma será más fácilmente comprendida haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se ofrecen a modo de ilustración, y que no tienen la intención de ser limitantes de la presente invención, a menos que así se especifique.

FOLIO
10

ADMISIÓN NACIONAL DE PATENTES

FOLIO
17

ADMISIÓN NACIONAL DE PATENTES

Ejemplo 1
Inducción de Isquemia

Ochenta cerdos Landrace con un peso aproximado de 25 Kg (aproximadamente 3 meses de edad) fueron sujetos al siguiente protocolo: 1) cada individuo fue sometido a un control clínico veterinario y de laboratorio para determinar su buen estado de salud, 2) bajo anestesia general (inducción: tiopental sódico 20 mg/kg; mantenimiento: 2% enflurano), se efectuó en cada individuo una toracotomía estéril en el cuarto espacio intercostal izquierdo y se realizó la disección del tronco proximal de la arteria coronaria circunfleja, 3) se colocó un constrictor ameroide en el tronco proximal de la arteria coronaria circunfleja de cada individuo y 4) se reparó la toracotomía.

Ejemplo 2
Estudios Basales Pre-tratamiento

Tres semanas después de la primera intervención quirúrgica según el ejemplo anterior se efectuaron los estudios basales (pre-tratamiento) de los individuos del ejemplo anterior bajo sedación con dosis suficientes de tiopental sódico endovenoso y bajo control electrocardiográfico. Se realizaron estudios basales de perfusión miocárdica en cada individuo, cuantificada mediante tomografía computada por emisión de fotón único, cámara gamma SPECT, con Tc⁹⁹ sestamibi ADAC Vertex Dual Detector Camera System (ADAC Healthcare Information Systems Inc., EE.UU.)

Las determinaciones se realizaron en reposo y esfuerzo. El esfuerzo se indujo farmacológicamente mediante dosis progresivas de dobutamina endovenosa hasta lograr un aumento de al menos un 50% sobre la frecuencia cardíaca de reposo.

Se seleccionaron los individuos con diagnóstico de hipoperfusión localizada en el lecho de la arteria coronaria circunfleja. Sólo veintiséis sujetos de la totalidad de los individuos operados inicialmente cumplieron con este criterio de inclusión (isquemia miocárdica crónica).

Ejemplo 3
Administración del Plásmido VEGF y Plásmido Placebo

Los veintiséis individuos isquémicos del ejemplo anterior fueron divididos en dos grupos: el primer grupo (Grupo I), integrado por 16 individuos, se destinó a estudios anatomofisiológicos y el segundo grupo (Grupo II), integrado por 10 individuos, se destinó al análisis de la presencia y expresión del plásmido VEGF.

Los individuos del Grupo I fueron randomizados en dos subgrupos (Grupo I-T y Grupo I-P) con igual cantidad de miembros (4 hembras y 4 machos para cada subgrupo). Se designó como Grupo I-T al grupo tratado y como Grupo I-P al grupo placebo control.

Los individuos del Grupo II fueron asignados a dos subgrupos (Grupo II-T y Grupo II-P). Se destinaron 8 individuos al Grupo II-T y 2 individuos al Grupo II-P. Se designó como Grupo II-T al grupo tratado y como Grupo II-P al grupo placebo control.

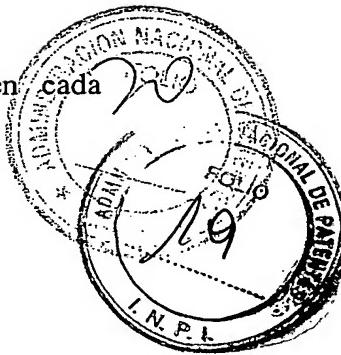
Bajo anestesia general (inducción: tiopental sódico 20 mg/kg; mantenimiento: 2% enflurano), se efectuó en cada individuo de los Grupos I y II una toracotomía estéril en el cuarto espacio intercostal izquierdo (reoperación).

Cada individuo de los Grupos I-T y II-T recibió 10 y 3 alícuotas respectivamente de 200 µl cada una de una solución conteniendo plásmido pUVEK15 (1,9 mg de pUVEK15 en 1 ml de solución fisiológica) codificante para factor de crecimiento del endotelio vascular.

Cada individuo de los Grupos I-P y II-P recibió 10 y 3 alícuotas respectivamente de 200 µl de una solución conteniendo plásmido pUVEK15^{-VEGF} (1,9 mg de pUVEK15^{-VEGF} en 1 ml de solución fisiológica) sin la región codificante para factor de crecimiento del endotelio vascular.

Cada alícuota fue inyectada intramiocárdicamente. El área de inyección estuvo integrada por la zona hipoperfundida, la zona de transición y el tejido normoperfundido inmediatamente circundante a la zona de transición. Las inyecciones se realizaron en dirección perpendicular al plano del miocardio, evitando la administración intraventricular del agente inductor. La administración de las inyecciones se distribuyó homogéneamente en el área de inyección. Una vez

realizadas las inyecciones intramiocárdicas, se reparó la toracotomía en cada individuo.



Ejemplo 4
Estudios Post-tratamiento

5

1. *Análisis Anatomofisiológicos*

A las cinco semanas de la segunda intervención quirúrgica (reoperación) se 10 efectuaron los estudios post-tratamiento de los individuos del Grupo I del ejemplo anterior bajo sedación con dosis suficientes de tiopental sódico endovenoso. Se estudió la perfusión en cada individuo siguiendo el protocolo establecido en el ejemplo 2.

Posteriormente, se sacrificaron los individuos y se realizó la necropsia para la 15 obtención de tejido miocárdico y tejidos periféricos (músculo esquelético, gónadas, hígado, pulmón, retina y riñón). Los tejidos obtenidos fueron sometidos a estudios anatopatológicos para identificar neoangiogénesis. Se realizó además la determinación de mitosis en tejido miocárdico. Las determinaciones se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: se fijaron los tejidos miocárdico y periféricos 20 en formaldehído al 10% y se realizó la inclusión en parafina Histowax. Posteriormente, se obtuvieron secciones de tejidos periféricos y del área de riesgo miocárdica de 4 a 5 μm de espesor. Las secciones fueron montadas en portaobjetos previamente bañados en una solución acuosa 0,01% de polilisina (Sigma Chemical Co., EE.UU.) y secados a 37° C. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina 25 y tricrómico de Gomori.

La identificación de los vasos intramiocárdicos y periféricos se realizó con microscopía óptica. Para la identificación de vasos intramiocárdicos con capa muscular lisa (arteriogénesis) se empleó inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra alfa-actina (Biogenex Labs. Inc., EE.UU.). Con respecto a los 30 vasos colaterales intramiocárdicos, se tomaron solamente en consideración los de 8 a 50 μm de diámetro máximo en ambos subgrupos de individuos. La densidad de longitud de los vasos intramiocárdicos relevantes fue cuantificada mediante un sistema digital de análisis (Vidas Kontron, Alemania). Además, se analizó la densidad de longitud para vasos intramiocárdicos de 8 a 30 μm . Los tejidos periféricos fueron

sometidos a un análisis histopatológico general para determinar angiogénesis y otros efectos adversos.

Para la identificación de las mitosis en el tejido miocárdico se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra el antígeno Ki67 (Novocastra Labs., Inglaterra) en el Grupo I. El antígeno Ki67 es una proteína nuclear que se expresa en todo el ciclo celular excepto en la fase G0 y G1 temprana. El patrón de su expresión no es afectado por el daño del ADN, ni por la inducción de apoptosis. Ver Brown, D., et al., *Histopathology*, 17:489-503 (1990); Gerdes, J., et al., *J. Immunol.*, 133:1710-1715 (1984); Ross, W., et al., *J. Clin. Pathol.*, 48:M113-117 (1995). Las células con estriaciones que presentaban una intensa tinción del antígeno Ki67 en sus cromosomas fueron identificadas como miocardiocitos en proceso mitótico. Para la determinación de la proporción de miocardiocitos en proceso mitótico, se cuantificó la cantidad de núcleos de miocardiocitos y de eventos mitóticos en el tejido miocárdico y se calculó la densidad de mitosis para cada individuo.

15

2. Presencia y Expresión del Plásmido VEGF

Luego de la segunda intervención quirúrgica (reoperación), se realizó el sacrificio de los individuos del Grupo II del ejemplo anterior. El sacrificio de los individuos se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: 2 individuos del Grupo II-T a 3 días posteriores a la reoperación, 2 individuos del Grupo II-T y 2 individuos del Grupo II-P a los 10 días posteriores a la reoperación, 2 individuos del Grupo II-T a 16 días posteriores a la reoperación y 2 individuos del Grupo II-T a 35 días posteriores a la reoperación. Luego de los sacrificios se realizaron las necropsias correspondientes.

25 Se obtuvo tejido miocárdico de los individuos.

El examen molecular se realizó en el tejido miocárdico de los individuos del Grupo II para identificar la presencia de ADN plasmídico, su transcripción (ARN mensajero) y su traducción (proteína). La presencia de ADN plasmídico fue determinada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ver Mullis, et al., *Meth. Enzymol.*, 55:335-350 (1987). La presencia de ARN mensajero se constató mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). Ver Belyavsky, et al., *Nucleic. Acids Res.*, 17:2919 (1989). La presencia de la proteína (VEGF humano) se evidenció mediante inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra VEGF humano (Biogenex Labs. Inc., EE.UU.).

Resultados

1. Análisis Anatomofisiológicos

5

Los estudios de perfusión y anatomopatológico demostraron la proliferación vascular en el tejido miocárdico de los individuos tratados. El estudio anatomopatológico reveló además la inducción de mitosis de miocardiocitos, endoteliocitos y células musculares lisas por parte del agente inductor (Grupo I-T).

10 Para la evaluación de los datos obtenidos con el estudio de perfusión, se determinaron los índices de esfuerzo y mejoría de perfusión para todos los segmentos miocárdicos, en cada uno de los individuos del Grupo I. Se estudiaron segmentos del área de riesgo. Se calculó entonces el promedio de estos segmentos miocárdicos, de manera tal que se obtuvo un valor único del área de riesgo para cada índice en cada
15 individuo. Finalmente, los índices obtenidos en cada individuo se promediaron para obtener los valores correspondientes a los Grupos I-T y I-P.

De esta manera, el análisis del estudio de perfusión demostró lo siguiente:

- a) Grupo I-P: ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el índice de esfuerzo pre-tratamiento y el índice de esfuerzo post-tratamiento (comparación apareada). Este resultado indica que no hubo cambios significativos en la perfusión del grupo placebo luego del tratamiento.
- b) Grupo I-T: índice de esfuerzo post-tratamiento significativamente mayor que el índice de esfuerzo pre-tratamiento (comparación apareada). Este resultado indica que el Grupo I-T mejoró significativamente su perfusión luego del tratamiento.
- c) Índices de esfuerzo pre-tratamiento: ausencia de diferencias significativas entre los Grupos I-T y I-P (comparación no apareada). Este resultado indica la homogeneidad de subgrupos antes de realizarse la intervención terapéutica.
- d) Índices de esfuerzo post-tratamiento: índice del Grupo I-T significativamente mayor que el correspondiente al Grupo I-P (comparación no apareada). Este resultado indica que, luego del

tratamiento, el Grupo I-T tuvo mejor tolerancia al esfuerzo que el Grupo I-P.

- 5 e) Índices mejoría de perfusión: índice del Grupo I-T significativamente mayor que el correspondiente al Grupo I-P (comparación no apareada). Este resultado indica que el Grupo I-T mejoró su perfusión mucho más de lo que lo hizo el Grupo I-P (el cual, en realidad, tuvo una tendencia a empeorarla).

10 En resumen, el estudio de perfusión evidenció diferencias estadísticamente significativas a favor del Grupo I-T tanto en los índices de esfuerzo como de mejoría de perfusión. Ver Tablas 1 y 2; Figs. 1 y 2.

El estudio anatomico patológico demostró una diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo tratado con respecto a los índices densidad de longitud y a la densidad de mitosis. Ver Tablas 3, 4 y 5; Figs. 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11.

15 Los resultados obtenidos confirmaron la proliferación neovascular en el tejido del grupo de individuos tratados *in vivo*. La proliferación vascular indica evidentemente un aumento en el número de células que constituyen estos neovasos (endotelioцитos y músculo liso vascular). Ver Figs. 10 y 11. Por lo tanto, la administración del agente inductor promovió la mitosis de estas células vasculares en los individuos tratados. Además, el grupo de individuos tratado con el agente inductor 20 demostró una proporción de miocardiocitos en proceso mitótico más de 5 veces mayor al grupo control. Ver Fig. 5, 7, 8 y 9; Tabla 5.

No se constató angiogénesis ni otros efectos adversos en tejidos periféricos de los individuos tratados (Grupo I-T).

25 2. Presencia y Expresión del Plásmido VEGF

Los estudios moleculares demostraron la presencia de ADN plasmídico en el tejido miocárdico de todos los individuos. En el grupo II-T se encontró ADN plasmídico codificante para VEGF en el tejido estudiado. En el grupo II-P se encontró 30 ADN plasmídico placebo en el tejido estudiado.

En el Grupo II-T se constató una curva de transcripción (presencia de ARN mensajero) con un pico en el día 10 post-reoperación. Ver Fig. 6; Tabla 6. La presencia de ARNm en el grupo II-P fue negativa.

La inmunohistoquímica reveló la presencia de proteína en miocardiocitos células del intersticio del tejido miocárdico en individuos del Grupo I-T (día 3). En individuos del Grupo I-P la inmunohistoquímica fue totalmente negativa.

5

Tabla 1

Índice de Esfuerzo				Valor de p (1) vs (2)	
Pre-tratamiento (1)		Post-tratamiento (2)			
Promedio	σ	Promedio	σ		
Grupo I-P	-0,6	2,2	-1,2	1,3	0,9
Grupo I-T	-3,1	2,2	3,8	1,3	<0,01
Valor de p I-T vs I-P	0,42		<0,02		

10

Tabla 2

Índice Mejoría de Perfusión		
	Promedio	σ
Grupo I-P	-0,6	2,6
Grupo I-T	6,9	2,6
Valor de p I-T vs I-P	0,058	

15

Tabla 3

Densidad de Longitud (8 a 50 μm)		
	Promedio	σ
Grupo I-T	2,45	0,40
Grupo I-P	1,35	0,26
Valor de p I-T vs I-P	<0,04	

Tabla 4

Densidad de Longitud (8 a 30 μm)		
	Promedio	σ
Grupo I-T	1,01	0,13
Grupo I-P	0,58	0,08
Valor de p I-T vs I-P	<0,02	

5

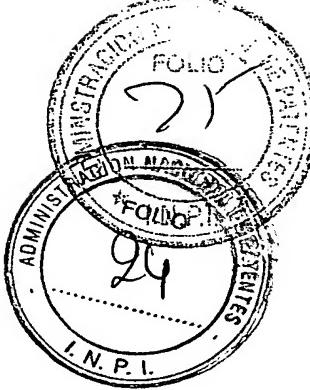
Tabla 5

Densidad de Mitosis		
	Promedio	σ
Grupo I-T	113,94	24,94
Grupo I-P	22,49	10,58
Valor de p I-T vs I-P	<0,005	

* * * * *

10

La presente invención ha sido descrita en detalle y ejemplificada para facilitar su comprensión y reproducción. Ciertos cambios en la manera de llevar a cabo la misma pueden ser realizados por una persona normalmente versada en la materia técnica relacionada sin exceder el objeto y alcance de las reivindicaciones de la 15 presente invención. Todas las publicaciones citadas se incorporan como referencias en su totalidad a la descripción de la invención.



Reivindicaciones



Se Reivindica:

1. Un método para inducir la proliferación neovascular y regeneración tisular caracterizado porque comprende administrar a un tejido una secuencia de nucleótidos codificante para el sitio activo de un polipéptido caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 1):

10	Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn
	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val
	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu
	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro
	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser
15	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys
	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro
	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile
	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His
	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn
20	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg
	Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys
	Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe	Val	Gln
	Asp	Pro	Gln	Thr	Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys
	Asn	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln
25	Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys
	Asp	Lys	Pro	Arg	Arg					

2. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque el tejido está compuesto por células eucariotas.
3. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque las células eucariotas comprenden células musculares.
4. Un método, según la reivindicación 3, caracterizado porque las células musculares comprenden células estriadas, lisas y mioepiteliales.



5. Un método, según la reivindicación 4, caracterizado porque las células estriadas comprenden miocardiocitos y células musculares esqueléticas.
6. Un método, según la reivindicación 5, caracterizado porque las células musculares esqueléticas comprenden células tipo I y tipo II.
7. Un método, según la reivindicación 4, caracterizado porque las células musculares lisas comprenden células musculares lisas vasculares y musculares lisas no vasculares.
8. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque las células eucariotas comprenden células de origen mamífero.
9. Un método, según la reivindicación 8, caracterizado porque las células de mamíferos comprenden células de origen porcino y humano.
10. Un método, según la reivindicación 9, caracterizado porque las células de mamíferos son células de origen humano.
15. 11. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir proliferación vascular localizada.
12. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir angiogénesis localizada, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
13. Un método, según la reivindicación 12, caracterizado porque comprende inducir angiogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
20. 14. Un método, según la reivindicación 12, caracterizado porque comprende inducir angiogénesis en tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
25. 15. Un método, según la reivindicación 12, caracterizado porque comprende inducir angiogénesis en tejido miocárdico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
16. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir arteriogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
30. 17. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir arteriogénesis localizada.
18. Un método, según la reivindicación 17, caracterizado porque comprende inducir arteriogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo* y *ex vivo*.

19. Un método, según la reivindicación 17, caracterizado porque comprende inducir arteriogénesis en tejido isquémico, *in vivo* y *ex vivo*.
20. Un método, según la reivindicación 17, caracterizado porque comprende inducir arteriogénesis en tejido miocárdico, *in vivo* y *ex vivo*.
- 5 21. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir vasculogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
- 10 22. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir vasculogénesis localizada.
23. Un método, según la reivindicación 21, caracterizado porque comprende inducir vasculogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo* y *ex vivo*.
- 15 24. Un método, según la reivindicación 21, caracterizado porque comprende inducir vasculogénesis en tejido isquémico, *in vivo* y *ex vivo*.
- 25 25. Un método, según la reivindicación 21, caracterizado porque comprende inducir vasculogénesis en tejido miocárdico, *in vivo* y *ex vivo*.
- 20 26. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir linfangiogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
27. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir linfangiogénesis localizada.
28. Un método, según la reivindicación 26, caracterizado porque comprende inducir linfangiogénesis en tejido normoperfundido, *in vivo* y *ex vivo*.
- 25 29. Un método, según la reivindicación 26, caracterizado porque comprende inducir linfangiogénesis en tejido isquémico, *in vivo* y *ex vivo*.
30. 30. Un método, según la reivindicación 26, caracterizado porque comprende inducir linfangiogénesis en tejido miocárdico, *in vivo* y *ex vivo*.



31. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir mitosis *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
32. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir mitosis en células eucariotas de un tejido de manera localizada.
- 5 33. Un método, según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende inducir mitosis en células eucariotas de un tejido normoperfundido, *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
- 10 34. Un método, según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende inducir mitosis en células eucariotas de un tejido isquémico, *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
35. Un método, según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende inducir mitosis en células eucariotas de un tejido miocárdico *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
- 15 36. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inducir la regeneración tisular.
37. Un método, según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende inducir la regeneración tisular en territorios normoperfundidos, *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
- 20 38. Un método, según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende inducir la regeneración tisular en territorios isquémicos, *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
39. Un método, según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende inducir la regeneración tisular miocárdica, *in vivo, in vitro* y *ex vivo*.
- 25 40. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos comprende ADN genómico, ADN copia y ARN mensajero codificante para el sitio activo del polipéptido de secuencia SEQ ID NO. 1.
41. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos comprende ADN genómico codificante para el sitio activo del polipéptido de secuencia SEQ ID NO. 1.
- 30 42. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos comprende ADN genómico, ADN copia y

- ARN mensajero codificante para el polipéptido de secuencia SEQ ID NO. 1.
43. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos está operativamente conectada a un vector.
- 5 44. Un método, según la reivindicación 43, caracterizado porque el vector comprende un vector viral.
45. Un método, según la reivindicación 44, caracterizado porque el vector viral comprende adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y lentivirus.
- 10 46. Un método, según la reivindicación 43, caracterizado porque el vector comprende un vector plasmídico.
47. Un método, según la reivindicación 46, caracterizado porque el vector plasmídico es pUVEK15.
- 15 48. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos se vehiculiza mediante el uso de un liposoma.
49. Un método, según la reivindicación 46, caracterizado porque el vector plasmídico se vehiculiza mediante el uso de un liposoma.
- 20 50. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos está contenida en una composición farmacéutica adecuada.
51. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la administración de la composición farmacéutica es por vía parenteral, sublingual, inhalatoria, oral y rectal.
- 25 52. Un método, según la reivindicación 51, caracterizado porque la administración de la composición farmacéutica por vía parenteral comprende intravascular, intracelómica, intramuscular, subcutánea, introrraquídea, tópica e intracardíaca.
53. Un método, según la reivindicación 52, caracterizado porque la administración intravascular comprende la administración endovenosa e intrarterial.
- 30 54. Un método, según la reivindicación 53, caracterizado porque la administración intrarterial comprende la administración intracoronaria, intraórtica, intrafemoral, intrapoplítea, intrapedia, intratibial posterior, intracarotídea e intrarradial.

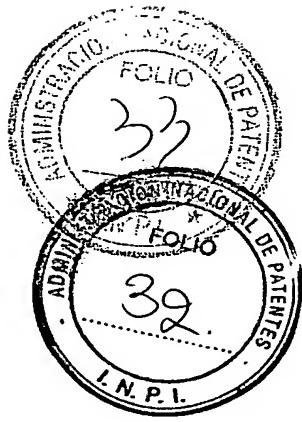


- 31
30
N. P. I.
55. Un método, según la reivindicación 52, caracterizado porque la administración intracelómica comprende la administración intrapericárdica, intraperitoneal, intraamniótica e intrapleural.
56. Un método, según la reivindicación 52, caracterizado porque la administración intramuscular comprende la administración intramiocárdica e intramuscular periférica.
57. Un método, según la reivindicación 56, caracterizado porque la administración intramiocárdica comprende la administración transepicárdica y transendocárdica.
- 10 58. Un método, según la reivindicación 51, caracterizado porque la administración tópica comprende la administración periadventicial, perivascular, epicárdica, epidérmica, transdérmica, oftálmica y por absorción mucosa.
- 15 59. Un método, según la reivindicación 58, caracterizado porque la administración por absorción mucosa comprende la administración a través de las mucosas conjuntiva, nasofaringea, bucofaringea, laringofaringea, vaginal, colónica, uretral y vesical.
- 20 60. Un método, según la reivindicación 59, caracterizado porque la administración por absorción a través de la mucosa bucofaringea comprende la administración a través de las mucosas yugal, gingivoyugal y gingivolabial.
61. Un método, según la reivindicación 52, caracterizado porque la administración intracardíaca comprende la administración intraatrial e intraventricular.
- 25 62. Un método, según la reivindicación 61, caracterizado porque la administración intraatrial comprende la administración intraatrial izquierda e intraatrial derecha.
63. Un método, según la reivindicación 61, caracterizado porque la administración intraventricular comprende la administración intraventricular izquierda e intraventricular derecha.
- 30 64. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende administrar la composición farmacéutica en dosis suficientes.

- 32
- 31
65. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende administrar la secuencia de nucleótidos por inyección intramiocárdica transepicárdica bajo visualización directa.
66. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende 5 inyectar la secuencia de nucleótidos perpendicularmente al plano del área de inyección.
67. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende inyectar la secuencia de nucleótidos homogéneamente en el área de inyección.
68. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende 10 administrar el sitio activo del polipéptido codificado por la secuencia SEQ NO ID. 1.
69. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende administrar el polipéptido codificado por la secuencia SEQ NO ID. 1.
70. Las composiciones farmacéuticas según la reivindicación 50.

The image shows two handwritten signatures in black ink, one on the left and one on the right, written over a rectangular stamp. The stamp contains the text "NÚMERO DE PAGO AL APLICARADO" in a bold, sans-serif font.

**Método para Inducir la Proliferación Neovascular
y Regeneración Tisular**



5

Resumen

La presente invención se refiere a un método para inducir la proliferación neovascular y regeneración tisular en mamíferos. El método reivindicado se caracteriza por administrar a un tejido una secuencia de nucleótidos codificante para el sitio activo del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El método induce la mitosis celular, la miocardiogénesis y la angiogénesis, arteriogénesis, vasculogénesis, linfangiogénesis en tejidos de mamíferos. El método utiliza un vector plasmídico para el transporte de la secuencia de nucleótidos codificante. La administración se realiza por vía intramiocárdica.

Indice de esfuerzo

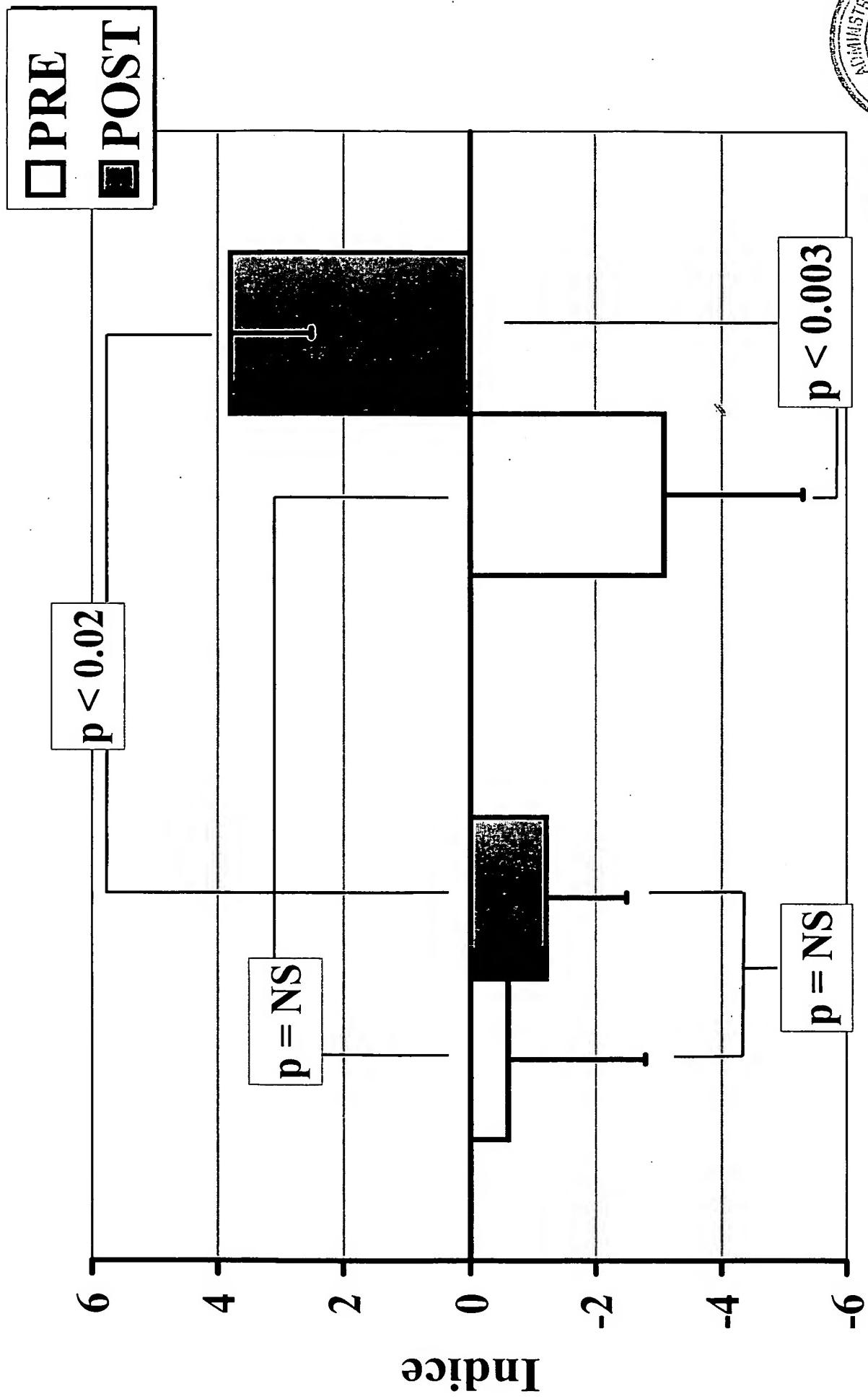
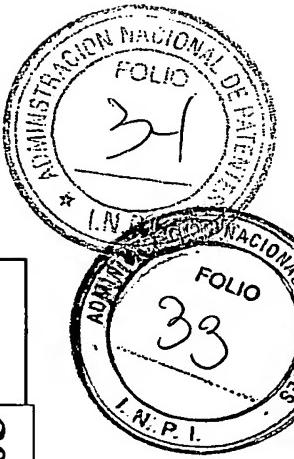


Fig. 1

VEGF

placebo

PRE
 POST



Índice mejoría de perfusión

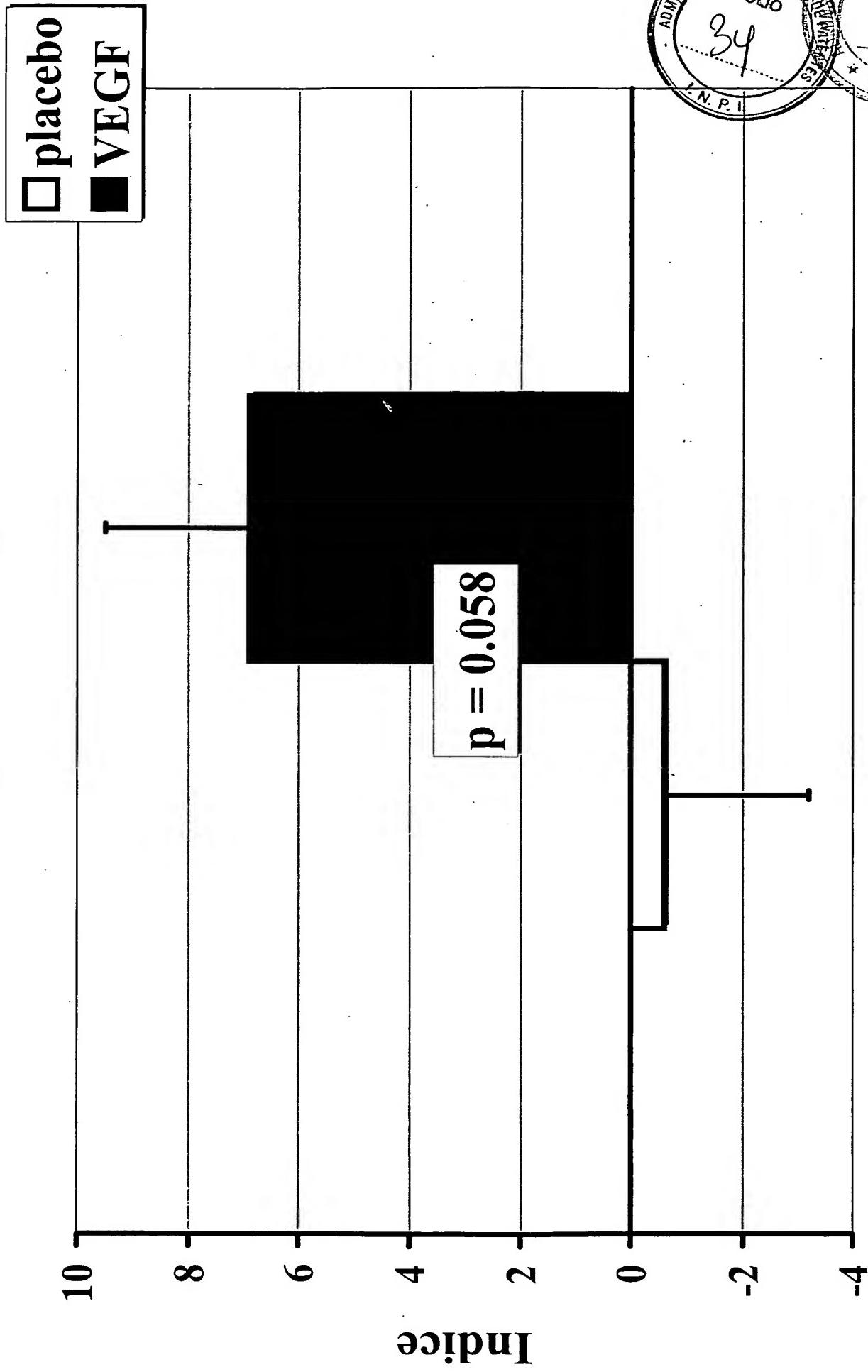
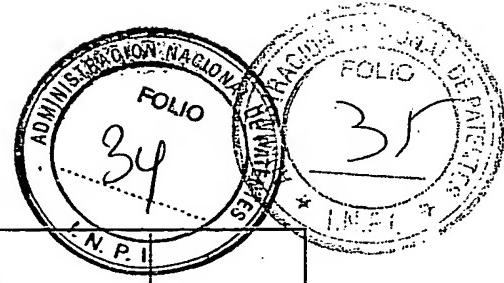


Fig. 2



Densidad de longitud

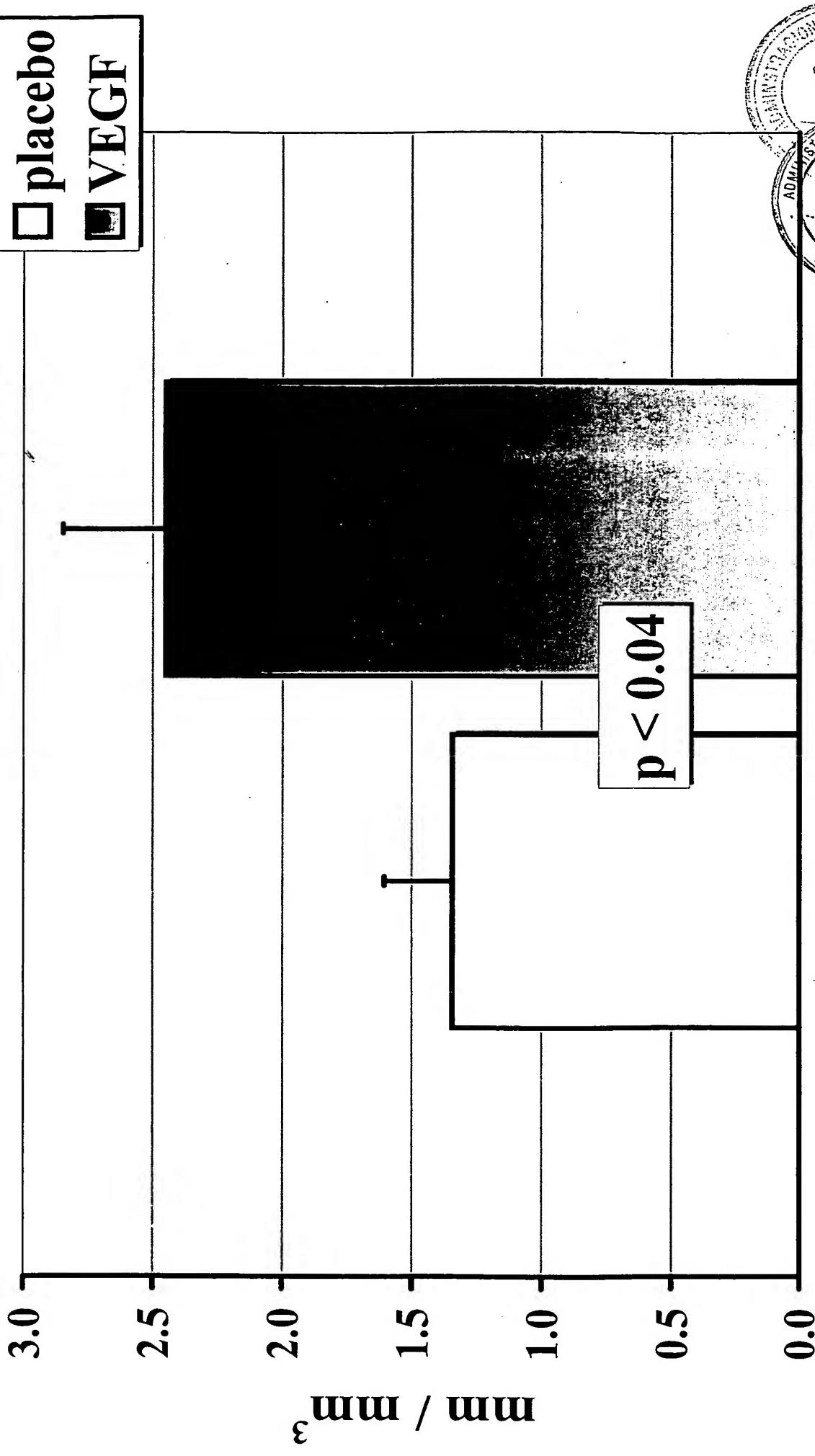
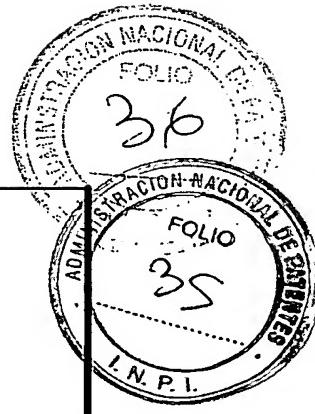


Fig. 3



Densidad de longitud

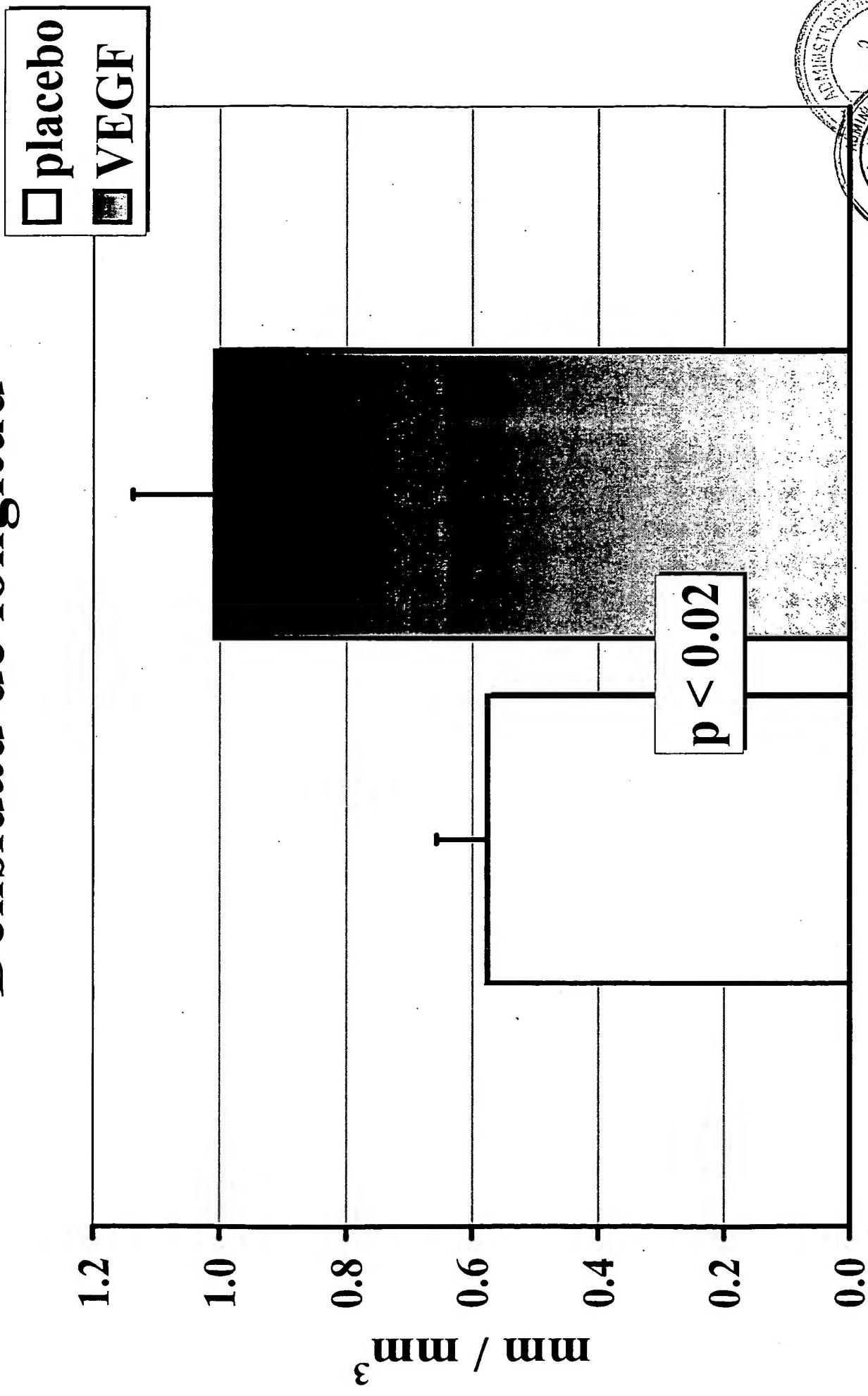


Fig. 4

Densidad de mitosis

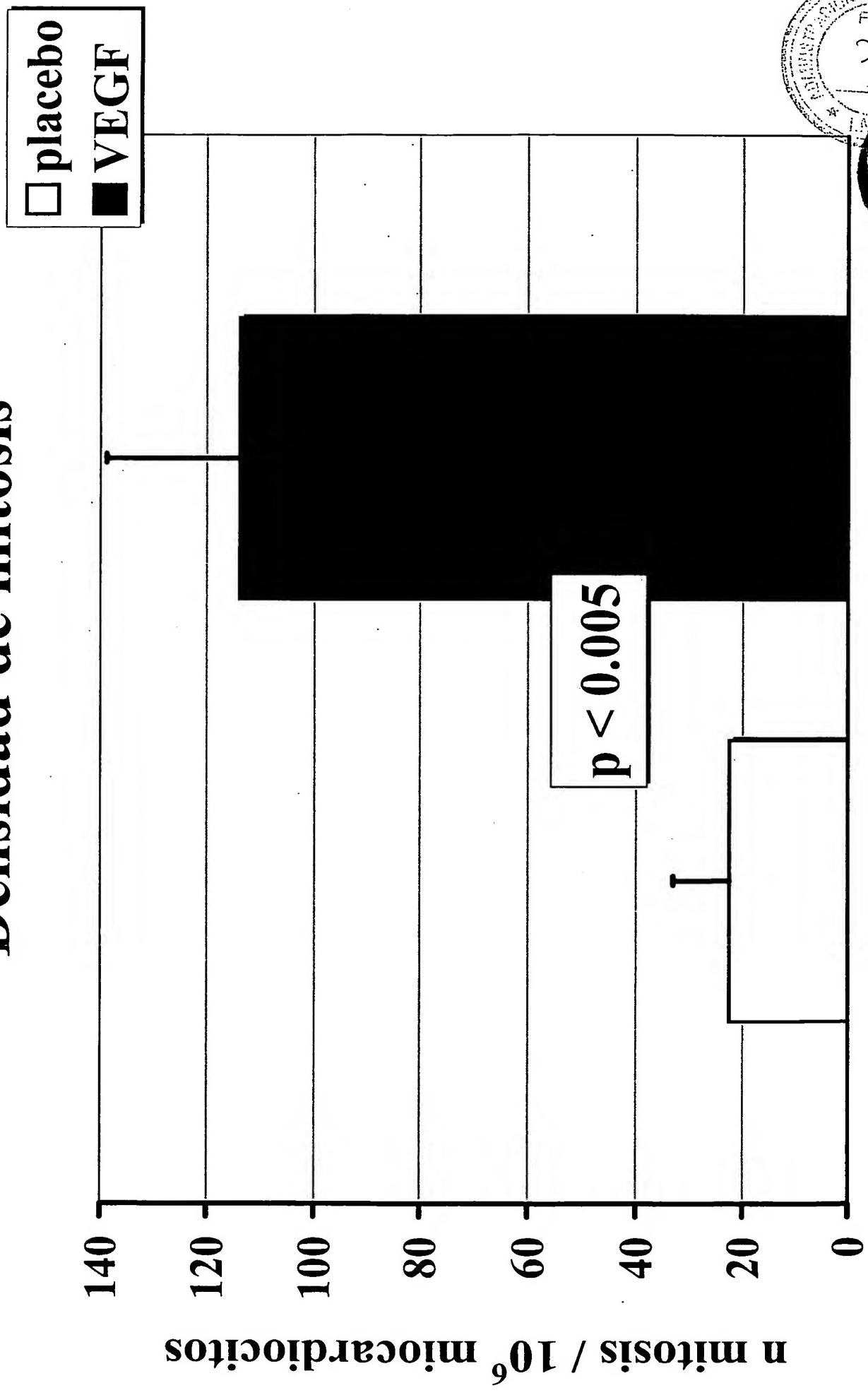


Fig. 5

Presencia de ARNm (grupo VEGF)

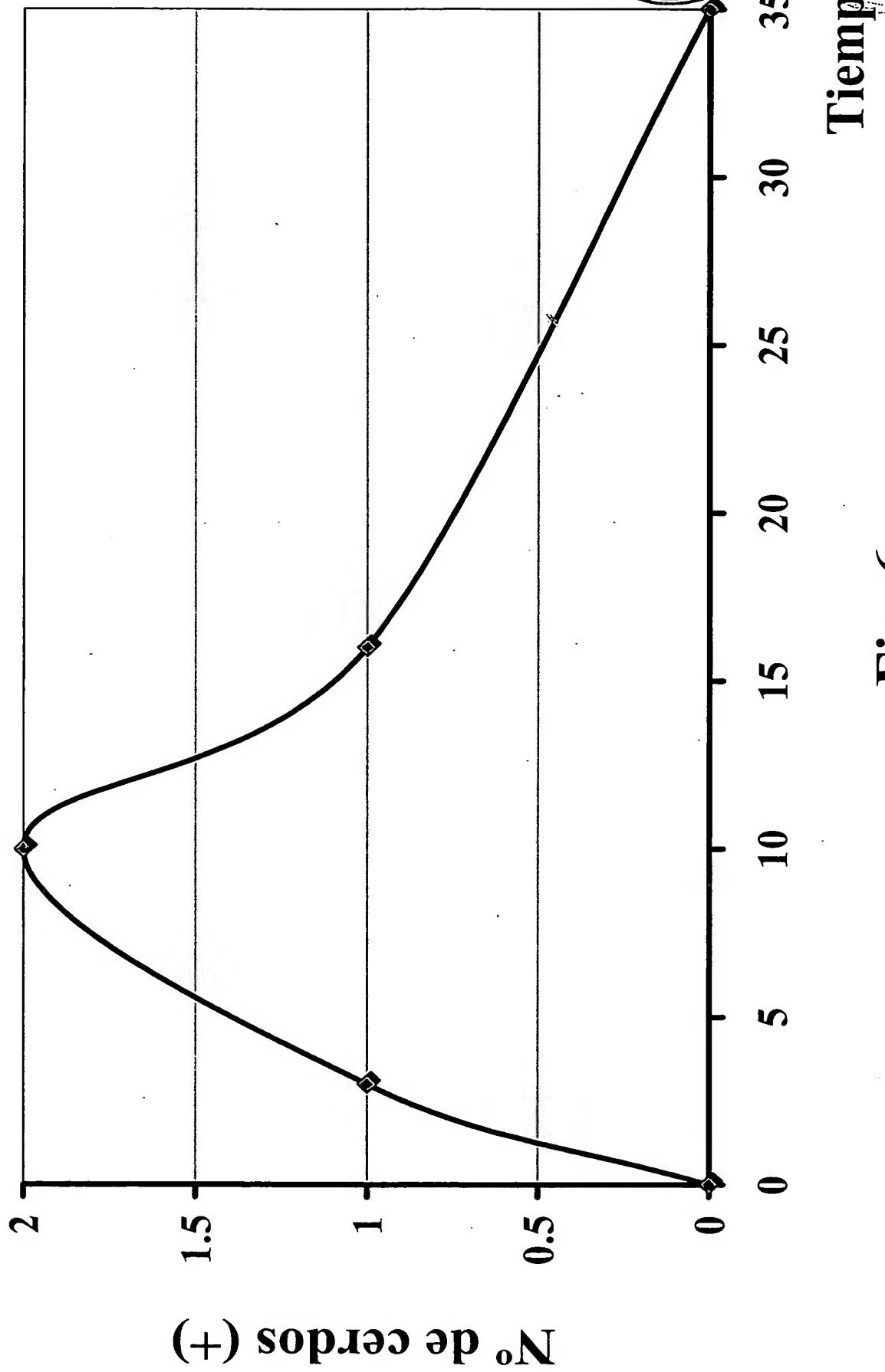


Fig. 6

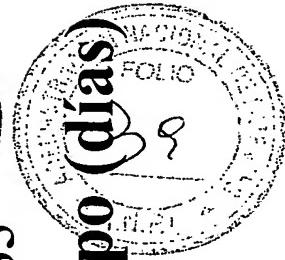




Fig. 7



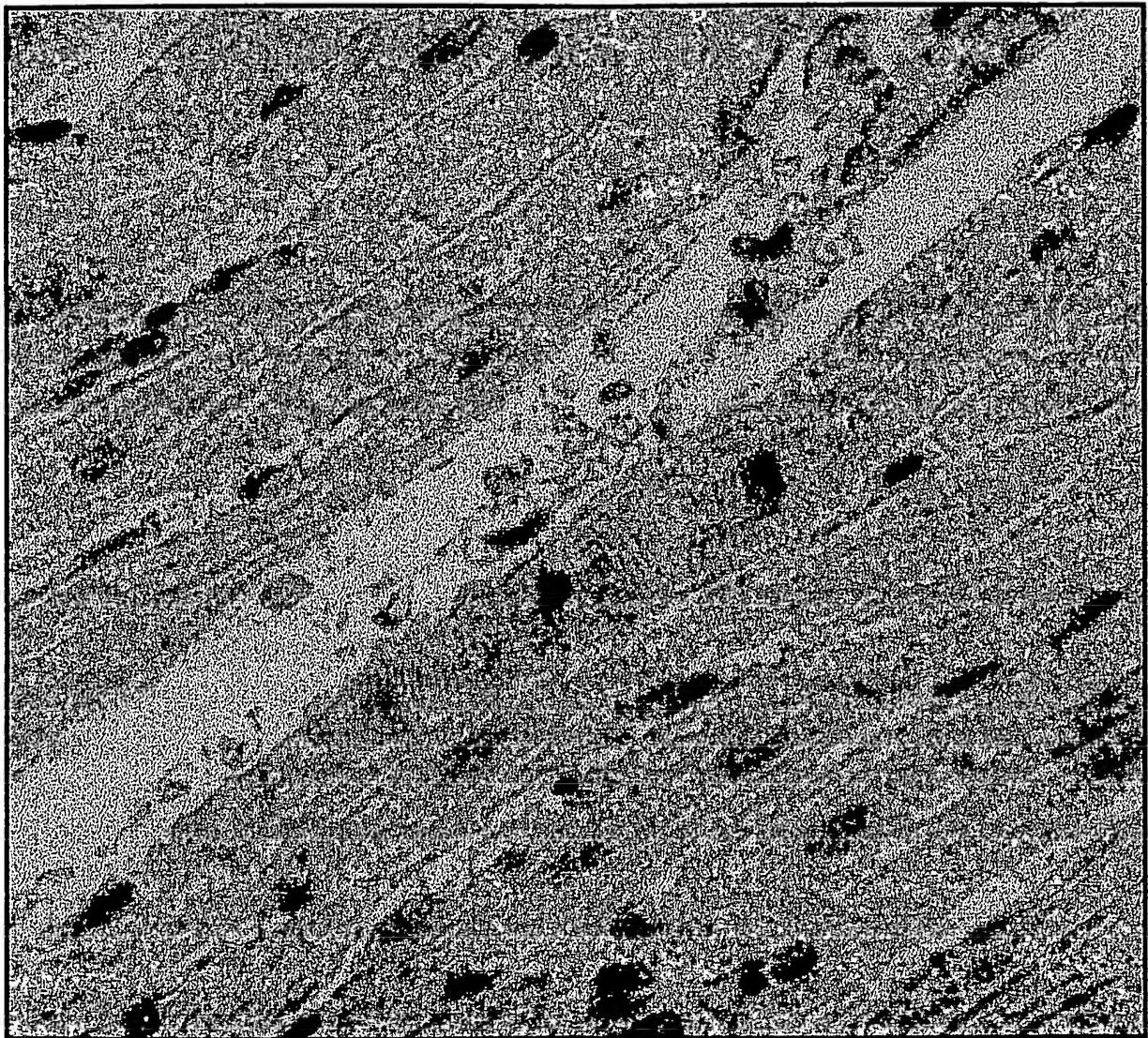
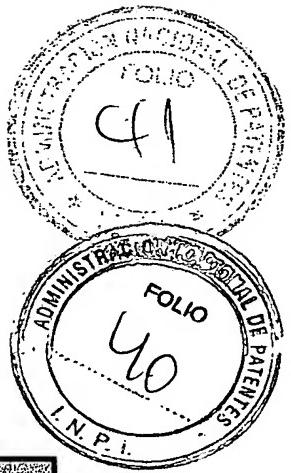


Fig. 8

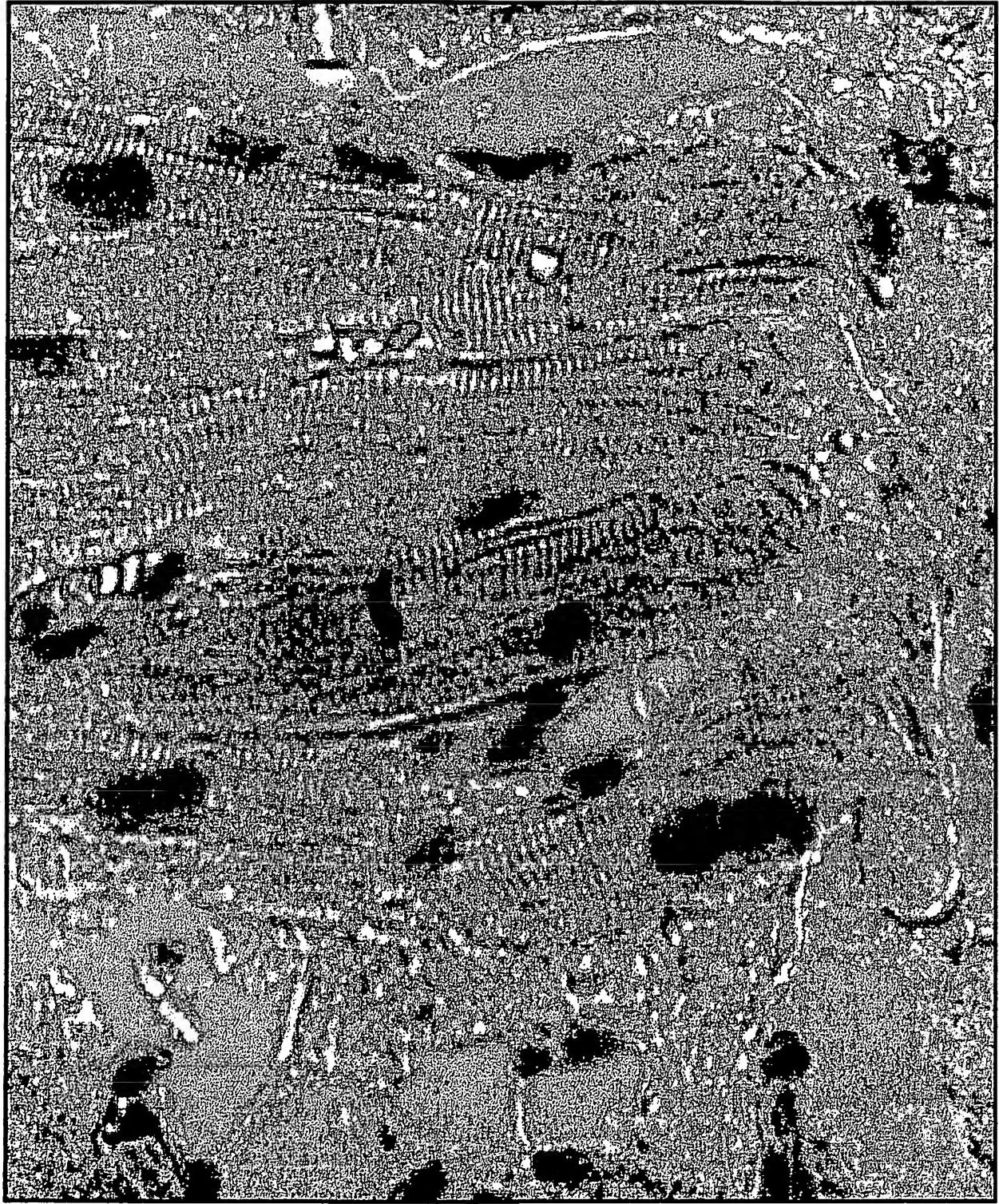


Fig. 9



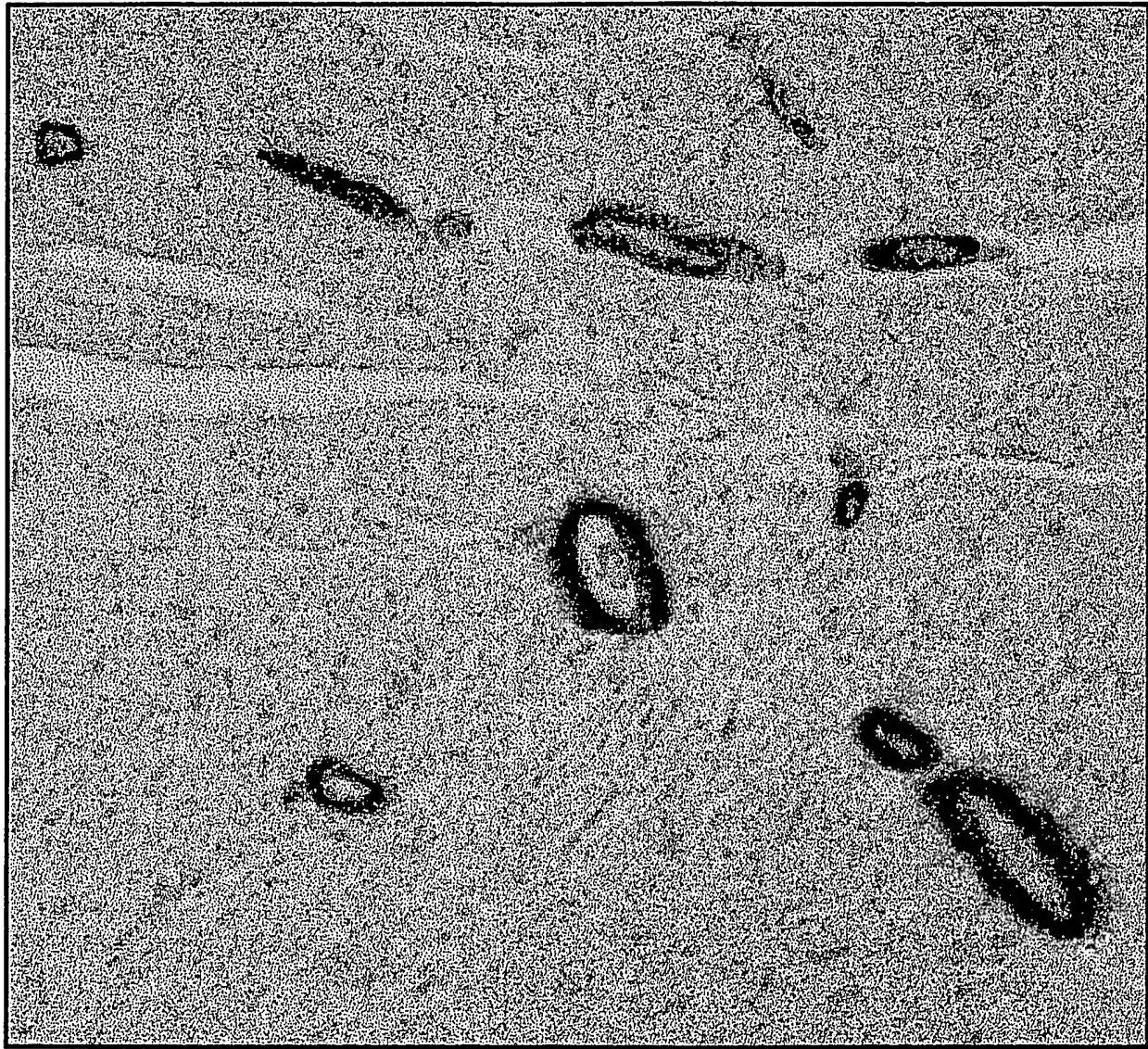
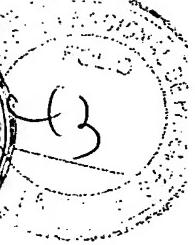


Fig. 10

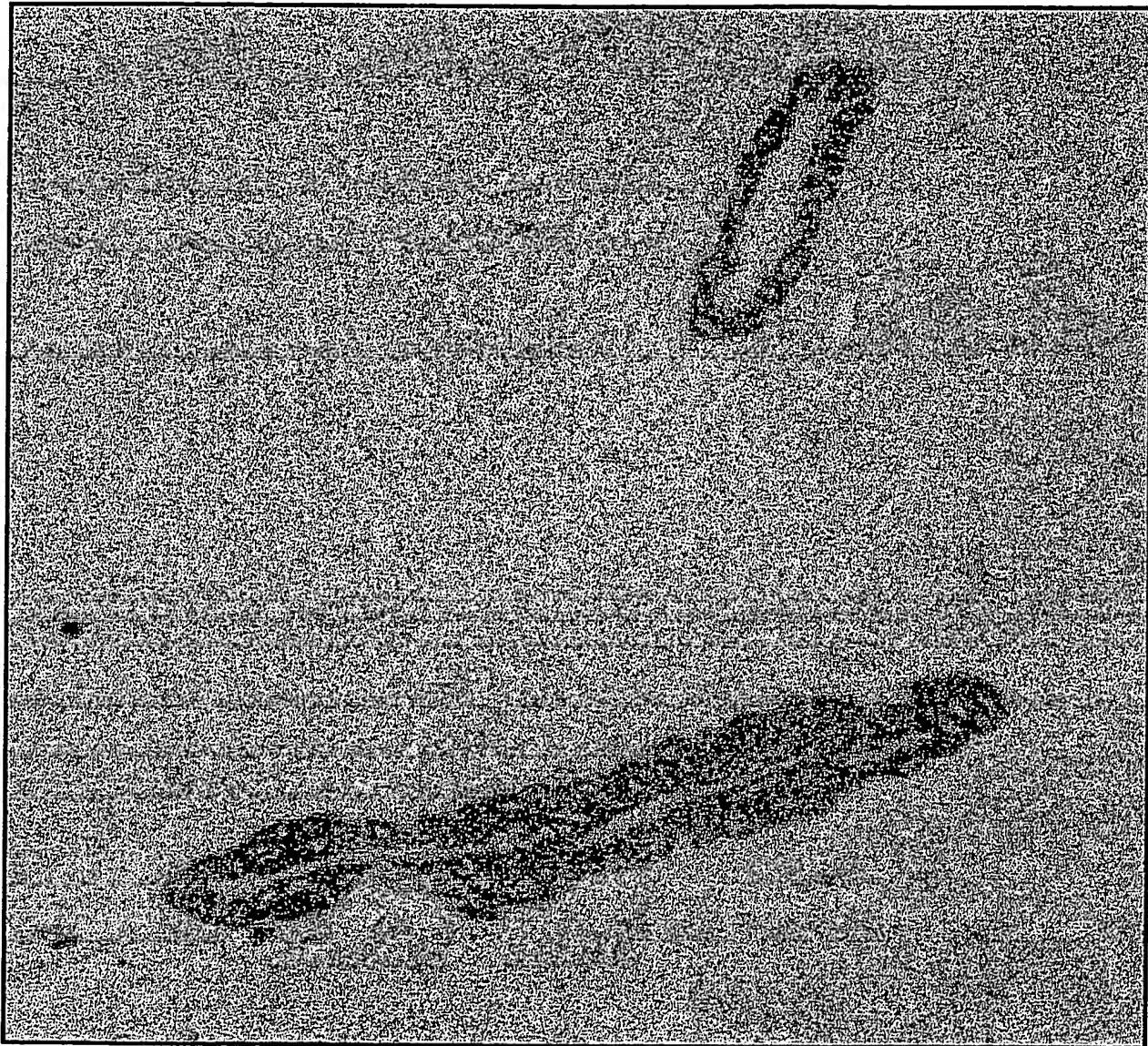
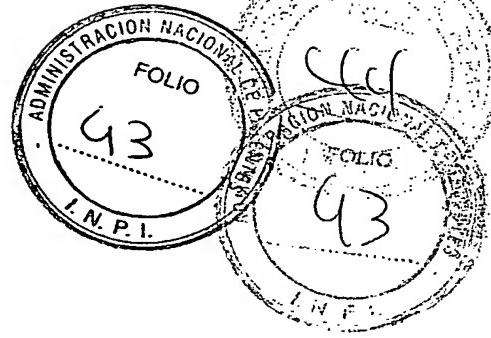


Fig. 11